

5-7 疾患モデルを駆使した筋ジストロフィーの治療法開発

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター
青木 吉嗣

総括研究報告

1. 研究目的

当研究班には疾患研究・筋学研究・神経科学研究のフロントランナーが参加し、3本の柱を軸とした独自のインハウス基盤研究を展開する。1つ目の柱は「疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発」である。これは班研究活動の中核であり、a. 疾患モデル動物やヒト 3D 培養疾患モデルの作出と評価、b. 遺伝子治療研究、c. 幹細胞研究、d. 新たな発想・技術に基づく治療開発を推進する。具体的には、エクソン・スキップ治療の課題克服のため、複数のエクソンを同時にスキップさせるマルチエクソン・スキップ治療や、骨格筋のみならず、心筋や神経系への薬剤デリバリー能を高め、全身的な治療を可能とする次世代核酸医薬の研究開発を行う。更に、新しい治療モダリティである mRNA 医薬、アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子治療やゲノム編集治療の有効性と安全性を、マウス・筋ジストロフィー・マイクロプタ・ラット等のモデルを用いて検証する。並行して、疾患モデル動物の筋機能評価系や、脂質解析手法について、プロトコルやマニュアルの準備を進める等、新しい治療モダリティ開発のためのプラットフォームを確立する。2つ目の柱は「筋ジストロフィーモデル動物の維持」、3つ目は「新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究」である。新しい疾患モデル・機能評価系・解析法について、プロトコルやマニュアルの準備を進める等、新しい治療モダリティ開発のためのプラットフォームを確立して、社会的、倫理的問題についても十分な検証を進めながら、新規治療法の臨床応用を図る。

2. 研究組織

主任研究者

青木 吉嗣

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

分担研究者

間野 達雄

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

野口 悟

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

村松 里衣子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

林 晋一郎

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

土肥 栄祐

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

若月 修二

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

峰岸 かつら

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

川内 大輔

国立精神・神経医療研究センター神経研究所

堀田 秋津

京都大学 iPS 細胞研究所

上住 聡芳

九州大学 生体防御医学研究所

深田 宗一郎

大阪大学 大学院薬学研究科

宮田 完二郎

東京大学 大学院工学系研究科

稲田 全規

東京農工大学 大学院工学研究院

岡田 尚巳

東京大学 医科学研究所

櫻井 英俊

京都大学 iPS 細胞研究所

金川 基

愛媛大学 大学院医学系研究科

山田 崇史

札幌医科大学 保健医療学部理学療法学科

出澤 真理

東北大学 大学院医学系研究科

奥野 恭史

理化学研究所 計算科学研究センター

池田 真理子

藤田医科大学病院 臨床遺伝科

大竹 正剛

静岡県畜産技術研究所 中小家畜研究センター

竹田 保

日本筋ジストロフィー協会

保田 昌彦

実験動物中央研究所

藤本 崇宏

京都府立医科大学 大学院医学研究科

3. 班会議報告

2023 年度開発費研究班会議を 12 月 19 日から 20 日にかけて教育研修棟でオンサイト開催した。当班の会議の特徴は、多数のアカデミアに加え、製薬系企業の関係者、患者会のメンバー、官庁の代表者が参加した点である。班会議は、希少神経筋難病の克服に向けて、非臨床・非競合領域での連携を強化する貴重な機会であり、国民との科学・技術対話を促進するものである。最先端研究成果の発表に加えて、研究への患者・市民参画（PPI）等の重要なテーマについて、活発な意見交換が行われた。

4. 疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発

班研究活動の中核である疾患モデル動物を用いた新たな治療法の開発において、有意義な進展があった。世界最小のマイクロミニブタ Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)モデルの作出に成功し、骨格筋および心筋病理を中心に解析を行い、論文投稿を完了した。ジストロフィン短鎖産物(Dp71)特異的タグ挿入マウスを作製し、小脳における Dp71 発現細胞の同定と Dp71 相互作用蛋白プロファイリングを行い、バーグマングリアにおいて Dp71 が AQP4 や Kir4.1 チャネル蛋白と共に機能することを発見した(Mol Neurobiol, 2023)。mdx52 マウスを対象に Dp140 mRNA を扁桃体に直接投与し Dp140 を発現させたところ、興奮性シナプス応答や社会性行動異常が改善した(Prog Neurobiol, 2023)。さらに、DMD に関しては、Gene Expression Omnibus に登録されているヒト脳組織の long-read snRNA-seq データ(GSE178175)を用いた検討により、DP140 が深部皮質の興奮性神経細胞、特にセロトニン受容体 HTR2C をマーカーとする細胞群に強く発現することを明らかにした(論文準備中)。

幹細胞研究では、尿由来細胞から運動ニューロンを分化させる手法を開発し、DMD 患者由来の尿由来細胞を用いて 3D 脳オルガノイドの作製に成功した。また、ヒト iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化・純化する方法として microRNA スイッチを用いた方法を開発した(iScience, 2023)。間葉系幹細胞が生体内で「場の論理」に応じてエラーなく分化し、傷害細胞を置き換える

機構を解明した(Cell Commun Signal)。さらに、骨格筋に内在する間葉系前駆細胞を発見し、この細胞が筋を維持・強化する一方で、線維化や脂肪化を引き起こして病態を悪化させる二面性を持つことを明らかにした(Nat Rev Endocrinol)。細胞の増殖に必要なマイクロサテライト座における TUG1 を介した R ループの意義も解明し発表した(Nature Communications, 2023)。

顕性遺伝型 LMNA 変異マウスモデルを作成し、心筋症を再現した。筋萎縮性側索硬化症モデルでは、症状の発症に先立ち血中飽和脂肪酸の含有量が低下し、オリゴデンドロサイトを介した脂肪酸の補充により筋萎縮性側索硬化症マウスの症状の進行が抑制できることを示した(Front Cell Neurosci, 2023)。

Nat. Commun. 2021 の成果に基づき、筋ジスマウスを対象に CRISPR-Cas9 を搭載した脂質ナノ粒子による in vivo ゲノム編集の実用化に向けた非臨床研究を推進した。また、Nucleic Acids Res 2021 で発表したアンチセンス配列予測のためのウェブインターフェース eSkip-Finder の配列予測精度を向上させ、その結果を報告した(Pharmaceutics, 2023)。これらの成果により、新規のエクソン・スキップ薬開発向け、配列予測から治療モダリティの有用性評価までをハイスループットに解析する基盤を確立した。

5. 筋ジストロフィーモデル動物の維持

筋ジストロフィーの病態解明や治療研究のため、筋ジストロフィー関連モデル動物を微生物学のおよび遺伝学的に統御し、多くの班員に供給した。また、モデルマウスの育成を目的に育種繁殖技術や生殖工学技術を開発し、これらの技術を応用して実験動物学的改良を行った。維持動物の品質管理として、ビニールアイソレーター内での定期的な微生物学のおよび遺伝学的モニタリング検査を実施している。筋ジストロフィーモデルマウスを維持し、分担研究機関を中心に国内研究機関に供給しており、令和 5 年には国内 22 機関に 52 回供給した。B10-mdx マウスの生産を日本クレア株式会社に移管し、新規モデルマウスを作出した。高水準の微生物・遺伝モニタリング検査を実施し、再現性あるモデル動物を供給することで、筋ジストロフィー研究に寄与している。供給実績は令和 4 年に次ぐ最高水準であり、特に国内製薬メーカーへの供給数が増加している。今後、モデルマウスの遺伝的信頼性を強化し、新規免疫不全モデルを構築して供給体制を整えとともに、胚バンクセンターとしての役割を充実させる。

6. 新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究

日本筋ジストロフィー協会は「根本治療法の確立」を最優先課題に掲げ、新薬承認手続きの改善と患者参画の強化に取り組んでいる。今回の調査では、患者のインターネット利用状況、医療情報の入手方法と信頼する情報源、新薬への関心、希少疾病患者が抱える困難の所在を把握することを目的とした。令和5年10月10日から11月10日に全国の筋ジス協会会員および北海道難病連所属の希少疾病患者 196 人を対象に無記名アンケート調査を実施した。結果として、筋ジス患者のパソコンとスマホの所有率は8割以上で、電子メールの利用が最多であった。9割が新薬開発に関心を持ち、ネットニュースや患者会の機関誌、テレビニュースを情報源と期待していた。97%が医者からの情報を信頼し、治療法不足(90%)や病院・医師不足(86%)が主な困難として挙げられた。インターネットを通じた医療情報の提供、新薬開発情報の発信を強化し、ペイシエント・ジャーニーに基づく分析を今後の調査に活用することが求められる。

今後の研究の進め方

引き続き、筋ジストロフィーを対象にした核酸医薬の開発基盤を横串に活用し、早期から製薬会社とも密に連携のうえ、筋ジストロフィーを中心とする様々な神経筋難病の克服を目指す。本研究では、開発してきたモデル動物を駆使して遺伝子・細胞・低分子治療等の先端治療モダリティの有効性と安全性を検証し、患者市民参画のうえ治療プロトコルやマニュアルの準備を進め、社会的、倫理的問題についても十分な検証を進める。神経筋疾患を対象に、エクソン 53 スキップ薬(ビルトラルセン)に続く新規治療法の実用化を目指す。当班の強みであるマウス、イヌ、マイクロプタ、ラット等の筋ジストロフィーモデル動物と機能評価系を駆使して、遺伝子治療、幹細胞移植治療、低分子治療等の基盤研究を更に推進する。また、神経筋難病患者の尿由来細胞分取・分化技術を駆使し、骨格筋、心筋、神経筋接合部、脳等の3D組織モデルを作製し、病態・治療研究を推進する。さらに、先端脂質解析を中心としたマルチオミックス解析技術を駆使し、新規疾患病態解明に加えて、バイオマーカー探索や治療評価法の確立を目指す。班研究成果の実用化に向け、AMED等の大型競争的資金獲得を引き続き積極的に進める。

最後に、学際性、国際性、公平性、倫理性、公開性を原則として、筋ジストロフィーに対して治療を開発するための伝統ある開発費研究班継続の機会を頂いたことに深く感謝したい。

分担研究者 間野 達雄

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第四部 室長

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン (DP) タンパクをコードする *DMD* 遺伝子の変異によって発症する遺伝性進行性筋疾患であり、中枢神経系の異常を伴うことがある。特に、DPの isoform の一つである DP140 が欠損する変異では、自閉スペクトラム症(ASD)様症状のリスクが高いことが知られている。本研究では、ヒト脳組織の long-read snRNA-seq データを用いて、DP140 の発現分布と ASD 様症状との関連性を検討した。

方法

Gene Expression Omnibus (GEO)に登録されているヒト脳組織の long-read snRNA-seq データ(GSE178175)を用いて解析を行った。このデータセットは、ヒト前頭前野の凍結組織から単離された核を用いて、10x Genomics のプラットフォームによってシングルセルレベルでの RNA-seq が行われたものである。Short-read および long-read snRNA-seq が共通の cellular barcode を有することを利用して、DP140 を発現している細胞群を同定した。

結果

Short-read snRNA-seq データの解析により、前頭前野の各種細胞種の同定を行なった。これらの細胞タイプはさらに細かなサブタイプに分類され、それぞれ特徴的な遺伝子発現プロファイルを示した。Long-read snRNA-seq データの解析の結果、DP140 は主に興奮性神経細胞で発現していることが明らかになった。さらに詳細に解析したところ、DP140 は皮質深層部の興奮性神経細胞、特にセロトニン受容体 HTR2C をマーカーとする細胞群に強く発現していることが明らかになった。一方、その他の細胞タイプや興奮性神経細胞のサブタイプでは DP140 の発現はごくわずかであった。

考察

本研究では、ヒト脳組織の long-read snRNA-seq データを用いて、DP140 の発現分布を明らかにした。その結果、DP140 は皮質深層部の興奮性神経細胞、特に HTR2C 陽性細胞に強く発現していることが明らかになった。HTR2C は、セロトニン受容体のサブタイプの一つであり、セロトニン系の機能に重要な役割を果たしている。一般的に自閉症では脳内セロトニン量の減少が知られており、セロトニン系の機能異常が ASD の病態生理に関与していると考えられている。本研究の結果から、DMD における ASD 様症状の基盤として、DP140 の欠損によるセロトニン系の機能異常が関与している可能性が示唆された。

結論

Long-read snRNA-seq データの解析により、DMD における ASD 様症状とセロトニン系の関連性が示唆された。DP140 は皮質深層部の興奮性神経細胞、特に HTR2C 陽性細胞に強く発現しており、DP140 の欠損がセロトニン系の機能異常を介して ASD 様症状を引き起こす可能性が考えられる。本研究の成果は、DMD における中枢神経系の異常の解明と治療法開発に寄与すると期待されるが、今後さらなる研究が必要である。特に、DP140 とセロトニン系の機能的な関連性を明らかにするための分子生物学的・電気生理学的な研究や、DP140 欠損モデル動物を用いた行動学的・病理学的な解析が求められる。

参考文献

1. Hardwick SA, Hu W, Joglekar A, Fan L, Collier PG, Foord C, Balacco J, Lanjewar S, Sampson MM, Koopmans F, Prijebelski AD, Mikheenko A, Belchikov N, Jarroux J, Lucas AB, Palkovits M, Luo W, Milner TA, Ndhlovu LC, ... Tilgner HU: Single-nuclei isoform RNA sequencing unlocks barcoded exon connectivity in frozen brain tissue. *Nature Biotechnology*, 40(7):1082–1092, July, 2022

顕性ラミノパチーマウスモデルの開発

野口 悟

国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部

緒言

LMNA 遺伝子は、核膜の裏打ちタンパク質である中間系フィラメント分子（構造タンパク質）であるラミン A をコードし、その変異は、早老症、心筋症、筋ジストロフィー、リボジストロフィーなどの様々な疾患を引き起こす。その中で、早老症については *LMNA* 遺伝子変異から引き起こされる詳細な病態メカニズムが知られている。成熟型への中間体であるファルネシル化された A 形ラミンがペプチダーゼによる切断を受けず、核内で封入体を形成し、細胞分裂時に核が不安定になり、細胞死が引き起こされるというものである。一方、心筋症／筋ジストロフィーを引き起こす *LMNA* 顕性変異からの病態機序については、心筋・骨格筋における収縮機械的ストレスに関連した MAPK 経路の活性化、細胞核の破壊、クロマチン DNA の核膜からの突出、ダメージ DNA の修復不全、ヘテロクロマチンの分布変化や遺伝子発現変化などが、複数の文献で提唱されている。しかしながら、示されている内容はそれぞれ異なり、統一的な理論の確立には至っていない。我々は、最近 *LMNA* 顕性変異により拡張型心筋症を発症するモデルマウスを作製することに成功し、このマウスを用いて骨格筋病態を解析した。

方法

ヒト患者変異を再現した *Lmna* 遺伝子変異ノックインマウスを、ゲノム編集によって作製した。骨格筋の筋力測定、組織染色は定法に基づいて行った。

Hela 細胞に、野生型および変異 *LMNA* を発現させ、変異タンパク質集合体形成に対を解析した。様々な、液-液相分離を阻害する化合物で処理した。さらに、ヘテロクロマチンを構成する場である液-液相分離との関連を調べた。

結果

Hela 細胞でのミオパチー型変異をもつ *LMNA* 変異体の過剰発現では、球状の構造物が核内に形成された。抗体染色では外側しか反応しなかったため、EGFP との融合タンパク質を発現させ、直接観察した。変異 *LMNA* は核内に球状の大きな構造物を形成した。この変化はドミナント効果であり、変異体とともに導入された野生型 *LMNA* も球状物に取り込まれた。液-液相分離阻害剤の処理により、球状物は消失、融合など短時間で動的变化を示し、安定な構造物ではないことが示された。また、ヘテロクロマチンタンパク質とは異なる分布を示した。

Lmna E383K ノックインマウスを作成した。約 30 週齢から致死を示し、心筋症を発症していた。心筋の電顕観察では、アポトーシスや mitophagy の所見が見られた。一方、骨格筋ではヒラメ筋に顕著な単収縮の低下が観察された。しかし、筋ジストロフィーの所見（壊死、再生像）は観察されなかった。筋線維径を測定した結果、平均径は低下していた。筋核の詳細解析では、核膜の崩壊はなく、異常な構造が観察され、電顕観察では、核膜の陥入と核膜を取り巻く細胞骨格の異常が顕著であった。ヘテロクロマチンの分布や量には異常は認めなかった。

考察

細胞実験では、変異 *LMNA* は液-液相分離を示し、凝集しているものと考えられたが意義は不明である。心筋症では心室内壁に線維化が多数みられることから、心筋細胞の変性を疑って解析を進めている。一方、骨格筋ではヒト患者で見られるような筋ジストロフィーの所見は見られず、筋萎縮とそれに伴う線維化を主とするミオパチーの所見が観察された。

結論

心筋症及び筋ジストロフィーの原因となる *LMNA* 遺伝子変異は、マウスで高齢発症の心筋症を引き起こしたが、骨格筋病態はミオパチー症状にとどまった。

神経筋疾患の臓器間ネットワーク解明ならびに低分子薬開発

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 神経薬理研究部

村松 里衣子

緒言

筋萎縮性側索硬化症は発症後数年で重篤な神経機能障害に陥る致死性の指定難病である。承認薬はあるもののその治療効果は十分ではなく、疾患の成り立ちを理解し、その機序に立脚した治療効果の高い薬剤の開発が患者や寄り添う家族から切望されている。筋萎縮性側索硬化症における神経機能障害のキーは神経細胞死であるが、細胞体の死に先立ち、神経回路の変性など組織学的変化が認められる。従来から、このような神経変性の機序の解明は、変性部位の近傍に備わる細胞や分子の機能解析により進められてきたが、分担研究者はこれまでに変性部位を取り巻く循環系の環境が変性誘導に関わる可能性について検討を進めてきた。昨年度までは、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの循環における代謝物含有量の変化に着目し、その変化が神経組織に与える作用について検討した。メタボローム解析から筋萎縮性側索硬化症モデルマウスは経時的に複数の脂肪酸の血中含有量を変化させることを見出した。また、脂肪酸の作用点を探索する際に、筋萎縮性側索硬化症患者検体でも認められるミエリンの脱落に着目した。ミエリンは、グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトから形成される構造物で、神経活動の伝導の高速化に関わることが知られる。昨年度は、マウスから採取したオリゴデンドロサイトを培養し、グルタミン酸による細胞死誘導に対する脂肪酸の保護効果を見出した。また cleaved caspase 3 染色を用いた検討から、グルタミン酸による細胞死に対する脂肪酸の保護効果は、カスパーゼ依存性の細胞死に対するものであることが示唆された。そこでこれらの *in vitro* の結果が *in vivo* での神経機能障害にも関わるものであるか検討するため、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスに対して脂肪酸を投与し、組織および

行動観察を実施した。

方法

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスは、家族性の筋萎縮性側索硬化症で高い頻度で認められる SOD1 遺伝子変異マウスを用いた(SOD1^{G93A})。脂肪酸を投与し、神経機能を行動試験により評価し、その後に脊髓組織を提出し、脊髓内の細胞死および炎症状態を可視化して観察した。

結果

本研究では脂肪酸の中でもリノール酸とオレイン酸に着目した。各脂肪酸を投与した SOD1^{G93A} マウスの脊髓組織では対照群と比較しオリゴデンドロサイトの数が多く、cleaved caspase 3 陽性オリゴデンドロサイト数も対象群より少なかった。また同条件において、リノール酸およびオレイン酸を投与した群では運動神経細胞数も対照群と比較して多く、一方でミクログリアの数には群間で差がなかった。運動機能評価のために Grip strength を行ったところ、リノール酸およびオレイン酸投与群では経時的なスコアの低下有意に減弱した。

考察

脂肪酸の作用点の一つにオリゴデンドロサイトの細胞死抑制を見出したが、脂肪酸の取り込みに関わる分子はオリゴデンドロサイトに限らず、神経細胞など多様な脳構成細胞に発現する。脂肪酸量の変化による個体レベルでの機能低下抑制効果には、オリゴデンドロサイト以外の細胞の寄与も影響しているかもしれない。

結論

オリゴデンドロサイトにおける細胞死抑制は、筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける症状悪化抑制の作用点である。

参考文献

Maruyama T, et al. Free fatty acids support oligodendrocyte survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2023;17:1081190.

R5 精神・神経疾患研究開発費

「疾患モデルを駆使した筋ジストロフィーの 治療法開発」班 報告書

分担研究課題名

シングル核解析による筋ジストロフィーの病 態解明

分担研究者 林 晋一郎

所属 国立精神・神経医療研究センター

神経研究所 疾病研究第一部

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）では筋サテライト細胞数が増加するとの報告がある（1）。しかしながら DMD 患者の骨格筋では筋再生不全が見られ、筋サテライト細胞が増加するにも関わらず筋再生能が低下する理由は明らかではない。一方、C57BL/10 や C57/BL6 をバックグラウンドとする mdx マウスの筋サテライト細胞は活発な増殖能を持ち、野生型と変わらない増殖能・筋再生能を有しており、ヒトで見られるような再生不全は起こらない（2）。これらのような理由から、DMD 筋において、サテライト細胞が DMD の病態にどのように関与しているかは一定の見解が得られておらず、不明である。そこで、本研究では、ヒト DMD およびより DMD の病態に近い表現型を示す DBA/2N バックグラウンドを持つ D2-mdx マウス（3）筋を用いてシングル核トランスクリプトームにより筋サテライト細胞の性状を解析した。

方法

ヒト DMD および正常凍結筋組織からセルソーターで細胞核のみを単離し、10X genomics 社のマニュアルに従いシングル核 RNA-seq ライブラリを作製した。シークエンス後、Seurat R

パッケージにより筋サテライト細胞集団について解析を行った。また、D2-mdx 大腿四頭筋からシングル核 RNA-seq ライブラリを作製し、同様に解析した。

結果

新鮮凍結筋組織より細胞核のみを単離し、シングル核 RNA-seq ライブラリを作製する手法を確立した。Seurat パッケージにより解析した結果、DMD の骨格筋では、筋細胞核の割合は正常コントロール筋と比較して減少する一方で、再生筋の筋核、マクロファージなどが増加した。筋サテライト細胞は成人のコントロールと比較すると数は増加したが、小児のコントロールと比較した場合には殆ど数は変化しなかった。興味深いことに、DMD の筋サテライト細胞は殆どが *MKI67* や *PCNA* といった細胞増殖マーカーを発現しておらず、休止状態のマーカーである *CALCR* を発現しており、休止状態にあると考えられた。また、*MYOD1* や *MYOG* を発現する活性化および分化途中にある筋細胞も殆ど存在しないことが明らかとなった。さらに、これら DMD の筋サテライト細胞では、*FOXO3* の発現が高いことが明らかとなった。D2-mdx の筋サテライト細胞においても、*Foxo3* の発現が野生型のサテライト細胞と比較して高く、ヒト DMD と共通であった。そこで、Foxo3 の阻害剤であるカルベノキシロン (Carbenoxolone: CBX) をマウスに投与したところ、筋サテライト細胞の活性化（Ki67 陽性の筋サテライト細胞数の増加）と筋再生の亢進（embryonic Myosin heavy chain 陽性筋線維数の増加）が見られた。

考察

シングル核 RNA-seq を用いた解析により、DMD 患者筋における筋サテライト細胞では、同年齢のコントロールと比較した場合、数は変わらず、その殆どが休止状態にあることが

誘導可能なことが示された。CBX は筋サテライト細胞の再活性化を誘導するが、ジストロフィン欠損による筋線維の脆弱化は防ぐことができない。CBX による筋サテライト細胞の再活性化と、エクソンスキップや遺伝子治療によりジストロフィンの発現を回復させる方法とを組み合わせることでより効果の高い治療法となると期待される。

結論

DMD 患者筋における筋サテライト細胞は殆どが休止状態にあることが明らかとなった。これらのサテライト細胞では *Foxo3* の発現が高く、モデルマウスである D2-mdx マウスでも同様に発現が亢進していた。また *Foxo3* のインヒビターである CBX を投与することにより、筋サテライト細胞を再活性化するという重要な知見を得た。

参考文献

1. Michael Kottlors, Janbernd Kirschner. Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. Cell Tissue Res . 2010 Jun;340(3):541-8.
2. Boldrin L, Zammit PS, Morgana JE. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. Stem Cell Res. 2015 Jan; 14(1): 20–29.
3. Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H. Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes. Am J Pathol. 2010 May;176(5):2414-24.
4. Garcia-Prat L, Perdiguero E, Alonso-Martín S, Dell'Orso S, Ravichandran S, Brooks SR, Juan AH, Campanario S, Jiang K, Hong X, Ortet L,

Ruiz-Bonilla V, Flández M, Moiseeva V, Rebollo E, Jordi M, Sun HW, Musarò A, Sandri M, Del Sol A, Sartorelli V, Muñoz-Cánoves P. FoxO maintains a genuine muscle stem-cell quiescent state until geriatric age. Nat Cell Biol . 2020 Nov;22(11):1307-1318.

細胞外小胞を活用した筋ジストロフィーの
治療開発

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第三部
土肥 栄祐

緒言

細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) はあらゆる細胞から分泌され、体液中から検出され、細胞特異性を持つ有望なバイオマーカーとして開発が急速に進んでいる。測定技術も発達しているが、新たな課題としてバイオバンク内に保存されている血漿に血小板が混入し、この混入した血小板から放出された血小板由来の EVs が下流の解析に影響を与えると報告された。またその他にも食事の影響や日内変動など、バイオマーカー解析に影響を与えうる様々な潜在的な交絡因子が推定されているが、詳細な検討は未だなされていない。また、これらの状況乗り越えるためには、EVs のバルク解析ではなく、一粒子レベルでの解析が求められている。そこで本研究では、細胞外小胞の内部にある miRNA をターゲットとした金粒子ビーコンを作成し、血清由来細胞外小胞の miRNA を検出することで、細胞特異的な EV の miRNA の検出系を樹立し、疾患を問わず詳細なバイオマーカー開発のための基盤技術を開発する。

方法

ヒト血液由来 EVs およびマウス血清由来 EVs の miRNA プロファイルを検討した既報文献に対しシステマティックレビューを行い、miRNA プロファイルの一貫性を検討する。

また、ヒト血漿から EVs を SEC にて抽出し、作成した金粒子分子ビーコンを処置し、NanoFCM にて計測することで、EV 一粒子レベルでの miRNA 検出を試みた。

結果

ヒト血液由来 EVs の miRNA プロファイルを見た研究では、研究間での一貫性が認められなかった。実験条件の整えやすいマウスの血清由来 EVs の miRNA プロファイルをみた研究においても研究間での一貫性が認められなかった。

金粒子ビーコンを用いた検出では、ヒト血漿由来 EV のうちの 1%弱しか検出ができなかった。そこで、EV 内へ金粒子分子ビーコンを導入するための Detergent の最適化を行うことで、miR-223-3p に関して 10%前後の EV に検出が可能となった。

考察

過去の報告ではマウス血清由来であっても miRNA プロファイルの一貫性が認められず、調整が十分できていない交絡因子の存在が考えられた。また EV 一粒子解析のための金粒子分子ビーコンの導入では、既報の方法では EV 抽出に用いた方法に依存する事が明らかとなり、抽出法ごとに Detergent の調整が必要であることが明らかとなった。

結論

EV 解析結果を評価するには、詳細な実験条件の把握が必要であり、未だ明らかでない交絡因子の同定が重要である。また、一粒子解析には、ビーコン開発に合わせ、EV 抽出法と導入方法の開発が併せて必要になる。

今後の展望

血小板の混入を抑えた条件にて EV 抽出条件を確立し、日内変動、食事の影響、など新たな交絡因子の同定を行う。また EV 一粒子レベルの解析技術を確立し、詳細なバイオマーカー創出を行う。

参考文献

なし

筋強直性ジストロフィーにおける CTG リ ピート不安定性の機序の解明

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第五部

若月 修二

緒言

筋強直性ジストロフィーI型 (DM1) は、筋萎縮や筋強直などのミオパチーや認知障害などの中枢神経系の異常を含む多臓器症状を特徴とする全身疾患である。ミオトニンプロテインキナーゼ遺伝子 (DMPK) の3'非翻訳領域に位置するCTGリピート配列の異常な伸長がDM1患者ゲノムに見出され、この変異遺伝子から産生される拡大CUGリピートを含む異常な転写産物が核内に蓄積し、さまざまなRNAのスプライシングに欠陥を誘発することが疾患の原因とされている。DM1患者では加齢や遺伝によりCTGリピート長が拡大する傾向があり、リピート長を不安定にする潜在的なメカニズムの存在が示唆されている。CTGリピート長はDM1の重症度と正の相関を示すことが知られている。これらのことから、CTGリピートサイズを拡大するメカニズムを明らかにすることは、病態の理解のみならず、治療法の開発においても極めて重要である。本研究では、DM1患者由来iPS細胞を研究対象として、CTGリピート長の拡大メカニズムの解明を目指す。

方法と結果

本研究では、リピート長の不安定性に関与する分子として我々がDM1-iPS細胞よ

り同定したZNF850の機能解析を通じて、CTGリピート長の不安定性に影響を及ぼす分子メカニズムを調査した。その結果、ZNF850の発現量はリピート長と正の相関を示すこと、また、ZNF850はCTGリピート配列に結合し、ミスマッチ修復系因子と近接することを明らかにした。これらの結果は、ZNF850がミスマッチ修復系のはたらきに介入することでリピート長の不安定性に影響を与える可能性を示唆した。

考察

ミスマッチ修復系がリピート長の不安定性を助長し、拡大させる可能性は既に指摘されている。例えば、ハンチントン病 (HD) や脊髄性小児失調症など、DM1以外のトリプレットリピート病においても、DNA修復遺伝子の多型性との関連が示唆されている。本研究により、トリプレットリピート病に共通するリピート長拡大の分子メカニズムが明確となり、その成果は治療法の確立につながると期待できる。

結論

DM1患者由来iPS細胞を研究対象として、CTGリピート長の拡大メカニズムを解明するためのヒト細胞モデルを確立した。

参考文献 (業績)

1. Numata-Uematsu Y., Wakatsuki S., Sakai K., Ichinohe N., Araki T. In vitro myelination using explant culture of dorsal root ganglia: an efficient tool for analyzing peripheral nerve differentiation and disease modeling. *PLoS One*. 2023. 18: e0285897.
2. Hagihara H. et al. (Wakatsuki S. as a co-authors) Large-scale animal model study

uncovers altered brain pH and lactate levels as a transdiagnostic endophenotype of neuropsychiatric disorders involving cognitive impairment. *eLife*. 12: 2023. RP89376. (2023)

3. Nagayama T., Yagishita S., Shibata M., Furuno F., Saito T., Saido TC., Wakatsuki S, Araki T. Transient sleep apnea results in long-lasting increase in β -amyloid generation and tau hyperphosphorylation. *Neurosci Res*. in press

筋強直性ジストロフィーに対する筋指向性脂質 付加 siRNA 医薬品の探索研究

国立精神・神経医療研究センター

神経研究所遺伝子疾患治療研究部

峰岸かつら

緒言

希少性難病である筋強直性筋ジストロフィー・タイプ1 (DM1) は成人最多の筋ジストロフィーである。原因遺伝子である DMPK 遺伝子の非翻訳領域にある CTG リピートは健常者では50リピート程度であるのに対し DM1 患者では数百〜数千リピートにまで伸長する。この伸長した CTG リピートが様々な遺伝子のスプライシング異常を引き起こすことで、筋力低下、ミオトニア、心機能異常といった症状が現れる。現時点では根治的な治療は存在せず対症療法にとどまっている。

近年、新規の治療モダリティの活用による DM1 に対する根本的な治療法の研究が国内外で盛んに行われている。しかし、核酸医薬の筋組織への移行性が不十分なことから、DM1 に対して有効な核酸医薬開発を成功させた例はない。我々は、共同研究者とともに筋指向性の高い医薬品を開発することを目指している。開発にあたって、モデル生物を用いた医薬品の有効性を評価することが必要である。そこで我々は DM1 モデルマウスの表現型を詳細に解析することで、治療薬の有効性を正確に効率的に評価する実験系の樹立を試みた。

方法

今回、我々はヒト DMPK を標的とする核酸医薬品の開発を念頭においていることから、CTG リピートが付加された Human DMPK 遺伝子を導入した DMPK* 24Lutzy/77J トランスジェニックマ

ウス (Homozygous) (ジャクソン・ラボラトリー) を用いて表現型の詳細な解析を行なった。

結果

このマウスの表現型を詳細に解析したところ、体重の減少に加え、以下のような特徴的な表現型が確認できた。

1) ミオトニア放電の測定

ミオトニア放電と呼ばれる DM1 の病態に特徴的な筋電図の波形を示した。

2) 心電図の測定

一部のマウスで PR インターバルが伸びるといった心伝導障害を示した。

3) 筋疲労の測定

麻酔下にて、マウスの足関節を固定し、下腿三頭筋に電気刺激を連続で 50 回負荷し、筋収縮を誘発し、その際に得られる発揮トルクをモニタリングすることで、筋疲労の程度を評価した。その結果、このモデルマウスは、野生型マウスに比べて、筋疲労しやすいことが明らかになった。

考察・結論

DMPK* 24Lutzy/77J マウスは DM1 の症状に特徴的な表現型を示した。よって、この DM1 モデルマウスは原因遺伝子である DMPK 遺伝子を標的にした核酸医薬の評価に適していることが明らかになった。しかしながら、今回、このマウスに対して機能的な解析はほぼ終了したものの、RNA foci やスプライシング異常の有無に関しては明らかになっていない。よって、今後は RNA foci の検出に加え、RNA seq を用いた網羅的なスプライシングバリエーション解析等を行う予定である。

【参考文献(業績)】

Motohashi N, Minegishi K, Imamura M, Aoki Y. Techniques for Injury, Cell Transplantation, and Histological Analysis in Skeletal Muscle. Methods Mol Biol

モデル動物を基盤とした脳腫瘍の新しい治療法開発に関する研究

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所・病態生化学研究部
川内大輔

緒言

小児脳腫瘍は小児がんのうち、致死率が最も高い疾患であり、腫瘍発生部位と分子解析データを元に分類されている。大脳皮質に生じるテント上上衣腫のうち約7割を占める RELA 型上衣腫は、上衣腫の中でも悪性度が高く、効果的な治療法がなく、主に外科的手術の成功率に依存する形になっている。そこで RELA 型上衣腫の腫瘍形成メカニズムを理解することにより、腫瘍増殖シグナルを見出し、それらを基盤とした新規の治療法の確立を目指す。

方法

RELA 型上衣腫では腫瘍特異的な融合遺伝子が発現することが知られている。これまでに融合遺伝子 ZFTA-RELA をマウス脳内に導入し、腫瘍形成を誘導することに成功した。次の研究段階として、融合遺伝子の下流で機能する遺伝子を抽出し、最終的にヒト・マウスで共通して働くシグナルを絞り込む。特に昨年度より ZFTA-RELA により直接発現が誘導される LICAM に着目し、ヒト上衣腫細胞株 EPINS を用いて細胞増殖における寄与を shRNA によるノックダウンを中心に解析を行う。特に LICAM の下流で働く分子の機能を探るために、HTS を行い、その結果からがんシグナルを特定する。

結果

ZFTA-RELA を発現するヒト上衣腫細胞株 EPINS において LICAM を shRNA を用いてノックダウンした結果、腫瘍増殖の低下と細胞死の増加が認められた。また LICAM と結合して細胞移動を担う分子 SHTN1 を shRNA で機能阻害した結果、同様の細胞増殖の低下が確認されたことから、LICAM-SHTN1 複合体が上衣腫増殖に非常に重要であることが考えられた。

この複合体の下流で機能するがんシグナルを推測するため、FDA 認可薬ライブラリを用いた薬剤スクリーニングを行った結果、YAPI と SRC シグナルを

中心としたシグナルの阻害剤がヒットし、実際にこれらの分子の shRNA による阻害は EPINS 細胞の増殖を阻害した。またヒト検体に対する ChIP-seq 解析により YAPI タンパクは ZFTA 型上衣腫に特徴的な遺伝子の遺伝子座に結合することが判明し、治療標的として有効ながんシグナル考えられる。

そこで YAPI の機能阻害剤である Verteporfin を EPINS に培養下で投与したところ、増殖効果の阻害が観察された ($IC_{50} < 1 \mu M$)。

考察

現存する治療に使用可能な LICAM 阻害剤は中和抗体が一般的で脳内への輸送が難しい。そこで下流のがんシグナルを同定することで上衣腫の治療につなげることが可能になると思われる。実際に YAPI の阻害剤は脳血液関門を透過可能であるため、In vivo で PDX に対する前臨床研究が期待される。

結論

悪性度の高い RELA 型テント上上衣種において新規の腫瘍標的分子 LICAM の細胞増殖への寄与を明らかにし、下流シグナルを同定した。

参考文献

Watanabe T, Mizuno HL, Norimatsu J, Obara T, Cabral H, Tsumoto K, Nakakido M, **Kawauchi D***, Anraku Y*. Ligand installation to polymeric micelles for pediatric brain tumor targeting. *Polymers*. 2023; 15(7):1808. PMID: 37050422

Okonechnikov K, Joshi P, Sepp M, Leiss K, Sarropoulos I, Murat F, Sill M, Beck P, Chan CH, Korshunov A, Sahm F, Deng MY, Dominik Sturm D, Desisto J, Donson A, Green AL, Robinson G, Orr BA, Gao Q, Darrow E, Hadley JL, Northcott PA, Gojo J, Ryzhova M, **Kawauchi D**, Hovestadt V, Filbin MG, Zuckermann M, Pajtler KW, Kool M, Jones DTW, Jäger N, Kutscher LM, Kaessmann H, Pfister SM. Mapping pediatric brain tumors to their origins in the developing cerebellum. *Neuro Oncol*. 2023; 25(10):1895-1909. PMID: 37534924

Ghasemi DR, Okonechnikov K, Rademacher A, Tirier S, Maass KK, Schumacher H, Joshi P, Gold MP, Sundheimer J, Statz B, Rifaioğlu AS, Bauer K, Schumacher S, Bortolomeazzi M, Giangaspero F, Ernst KJ, Clifford SC, Saez-Rodriguez J, Jones DTW, **Kawauchi D**, Fraenkel E, Mallm J-P, Rippe K, Korshunov A, Pfister SM, Pajtler KW. Compartments in medulloblastoma with extensive nodularity are connected through differentiation along the granular precursor lineage. *Nat Commun*. Accepted.

筋ジストロフィーに対する汎用性の高いゲノム編集修復技術の開発研究

堀田 秋津
京都大学 iPS 細胞研究所

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子変異が原因となって引き起こされる。したがって、この原因たる遺伝子変異を修復できれば根治に繋がると期待される。しかしながら、ジストロフィン遺伝子は巨大で、従来の遺伝子治療用ベクターでは導入することは困難であった。一方、アンチセンスオリゴを利用してジストロフィン遺伝子の特定のエクソンをスキッピングさせることによりジストロフィンの蛋白質読み枠を回復できることが知られており、世界中で研究開発と臨床研究が進められている。しかしながら、アンチセンスオリゴは mRNA に作用するため、効果は一過性であり、治療効果を生涯にわたって継続させるためには、頻回繰り返し投与が必要となる。そこで我々は、新たに登場した CRISPR ゲノム編集技術に注目し、ゲノムレベルでエクソンスキッピングを誘導する事を目指す。

我々は以前、DMD 患者由来 iPS 細胞において、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いたエクソンスキッピングによってジストロフィンの遺伝子変異を修復できることを報告した[Li HL et al., Stem Cell Reports, 2014]。また、我々の報告と前後して、他の複数の研究チームもゲノム編集技術を利用したジストロフィンのエクソンスキッピングを mdx マウスやイヌ、ブタモデルで報告している。

しかし、DMD 患者においては変異エクソンがジストロフィン遺伝子上の広範囲に分布しており、単一のエクソンを標的としたエクソンスキッピングでは、最大でも十数%程度の患者にしか適応できない。この狭い適応範囲を拡大するためには、変異エクソンが集積するエクソン 45 からエクソン 55 の領域を一度にスキップさせる“マルチエクソンスキッピング”が有効であることが示されている[Aoki Y., et al., PNAS, 2012 | Young, C. S. et al. Cell Stem Cell, 2016]。しかしながら、CRISPR-Cas9 を用いた微小 DNA 欠失誘導では、340 kb もの巨大領域に跨る複数のエクソンを同時に欠失させることは難しい。

この問題に対し我々は、数 kb から数十 kb の DNA

切断誘導が可能である CRISPR-Cas3 [Morisaka H et al., Nat Commun, 2020]に着目し、ゲノム上で巨大欠失を誘導することで、多数の DMD 患者に適応可能なマルチエクソンスキッピング誘導方法を開発に取り組んだ。

方法

患者由来 iPS 細胞での CRISPR-Cas3 を用いたゲノム編集効率を高めるべく、細胞への導入方法の条件検討を行う。また、長距離切断を効率良く検出して切断パターンを解析するために、ロングリードシーケンサーを用いた解析系を立ち上げる。

結果

CRISPR-Cas3 と 2 つの crRNA を搭載し発現するベクターを、DMD 患者由来 iPS 細胞株に導入し、マルチエクソンスキッピングが誘導できた iPS 細胞株において、ジストロフィタンパク質の回復を確認することが出来た。また、同様の結果を 3 名の DMD 患者由来 iPS 細胞で確認した他、全ゲノムシーケンスを行い目立ったオフターゲット変異は検出されなかった。以上の結果については昨年論文発表を行った[Kita Y et al., Stem Cell Reports, 2023]。また、さらなる Cas3 ゲノム編集効率向上に向けて、発現ベクターの検討を行った。また、Nanopore シーケンサーの実験系を立ち上げ、長距離ゲノム DNA 切断を簡便に検出できるようになった。

考察

Dual-Cas3 は長距離切断に有効な手法であるが、効率を向上させる必要がある。細胞への導入部分が律速と考えており、様々な発現方法や導入方法を今後、検討する必要がある。

結論

Dual-Cas3 システムを利用することにより、340 kb もの巨大なゲノム DNA 領域を欠失させ、マルチエクソンスキッピングによる汎用性の高いジストロフィタンパク質修復に成功した。現在、さらなる効率向上に取り組んでいる。

参考文献

Li HL et al., Stem Cell Reports, 2014

Aoki Y., et al., PNAS, 2012

Young, C. S. et al. Cell Stem Cell, 2016

Morisaka H et al., Nat Commun, 2020

Kita Y et al., Stem Cell Reports, 2023

間葉系前駆細胞を標的とした新たな筋ジストロフィー治療法の開発

上住聡芳
九州大学

緒言

筋ジストロフィーでは、骨格筋の脂肪化・線維化が生じ病態の進行に寄与する。脂肪化・線維化はそれ自体が筋力・筋機能低下の要因となるだけでなく、他の治療法（細胞移植治療や遺伝子治療）の効率を低下させることにもつながり問題となる。骨格筋の脂肪化・線維化の原因は長らく不明であったが、分担研究者らは筋間質に存在し筋衛星細胞とは異なる間葉系前駆細胞の同定に成功し、この細胞が脂肪化・線維化の起源となることを世界で初めて明らかにした^{1,2)}。間葉系前駆細胞は病態に寄与する一方、再生過程では筋衛星細胞を支持するニッチ細胞として機能し、筋再生を促進する³⁾。さらに、分担研究者らは定常状態の筋の維持に間葉系前駆細胞が必須の役割を果たしていることも明らかにしている⁴⁾。このように、間葉系前駆細胞には筋にポジティブな影響を及ぼす側面とネガティブな影響を及ぼす側面の二面性が存在する。よって、真に効率的な筋ジストロフィーの治療には間葉系前駆細胞の二面性を理解し、制御することが必要になる。本研究では、脂肪化・線維化の原因となる間葉系前駆細胞を制御する手法の開発に取り組む。脂肪化・線維化の責任細胞に焦点を当て、研究開発を行うことで、これまで不可能であった脂肪化・線維化を抑制する画期的治療が可能になると期待される。また、間葉系前駆細胞による筋衛星細胞支持機能を明らかにできれば、筋再生促進療法へ発展することも期待できる。さらに、原因遺伝子の発現回復を図る他の根本的治療法の治療効果を向上させることにもつながるため、本研究は筋ジストロフィー治療の実現に資する有益な成果をもたらすと考えられる。

方法

本研究では、間葉系前駆細胞を制御することで脂肪化・線維化を抑制し、筋再生を促進する筋ジストロフィーの治療法開発を目指す。
すでに、間葉系前駆細胞の二面性の解析、および、

ヒト骨格筋由来の高品質な間葉系前駆細胞を利用した薬剤スクリーニングからレチノイン酸シグナルが間葉系前駆細胞の病的表現型を抑制することを見出している。レチノイン酸シグナルによる間葉系前駆細胞の制御機構を生体内で明らかにするため、間葉系前駆細胞特異的にレチノイン酸シグナルが阻害されるマウス（Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウス）を作製し、表現型を精査した。

結果

レチノイン酸シグナルの機能的意義を精査するため、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスを用いて筋再生過程を精査した。コントロールマウスと比較して、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスでは、筋再生に不全を来した。Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスの間葉系前駆細胞における変化を調べたところ、myogenesis 関連遺伝子の発現低下が見られた。また、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスの間葉系前駆細胞では炎症関連遺伝子が高発現することも見出した。この遺伝子発現を反映し、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスでは、炎症の収束が顕著に遅延していた。

考察

Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスの表現型から、レチノイン酸シグナルによって間葉系前駆細胞における遺伝子発現が変化し、筋再生を支持すると同時に、炎症を収束させる機能も発揮していると考えられた。

結論

間葉系前駆細胞は、筋再生の支持と炎症の収束に必要な役割を果たしており、間葉系前駆細胞における cell-autonomous なレチノイン酸シグナルが、この作用の中心的な分子機構であると考えられた。

参考文献

- 1) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al., Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. Nat Cell Biol 12(2):143-52. 2010.
- 2) Uezumi A, Ito T, Morikawa D et al., Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. J Cell Sci 124(Pt 21):3654-64. 2011.
- 3) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis

and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol* 5: 68. 2014.

4) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H et al., Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J Clin Invest*. 131(1):e139617. 2021.

筋再生を制御する細胞間ネットワーク解析 —運動刺激時におけるカルシトニン受容体の 役割—

深田 宗一朗

大阪大学大学院薬学研究科

再生適応学分野

張 礫丹*, 岩森歌奈子*

*大阪大学大学院薬学研究科

再生適応学分野

緒言

筋ジストロフィー治療開発において、「遺伝子・核酸・ゲノム治療」、「薬物治療」、及び「幹細胞・再生治療」の三つが基盤となる治療の柱として挙げられている。これらの中で、他の治療法には見られない「幹細胞・再生治療」の最大の長所は、失われた筋線維を新たに再構築できる点にある。しかし、この「幹細胞・再生治療」は局所の細胞移植が想定されており、全身性の疾患である筋ジストロフィーにおいては、これが常に課題となっている。筋サテライト細胞の機能低下は、筋ジストロフィーの病態進行と深く関連しているため、人為的に全身の筋サテライト細胞の再生能力を向上させることができれば、「幹細胞・再生治療」のブレイクスルーになることが期待される。

分担者らはマウスの筋肥大モデルや運動モデル等において、負荷筋の筋サテライト細胞が実質的に増殖することを発見している[1,2]。実験的な筋再生モデルと比較して、これらのモデルにおける筋サテライト細胞の周辺環境の変化は劇的ではないため[2]、筋サテライト細胞の増殖及び自己複製機構の解明において、非常に優れたモデルと考えられている[3]。本研究では、これら非再生筋での筋サテライト細胞の動態や分担者がこれまで行ってきた筋サテライト細胞の維持機構の研究から[4-6]、全身の筋サテライト細胞の増殖を誘導する手法開発のための基礎的な検討を行った。

方法

マウス

筋サテライト細胞特異的カルシトニン受容体欠損マウス(cKO: $Pax7^{CreERT2+}::Calcr^{flox/flox}$)、カルシトニン受容体と gp130 の二重欠損マウス(cDKO: $Pax7^{CreERT2+}::Calcr^{flox/flox}::gp130^{flox/flox}$)を当

該施設の倫理規定に従い飼育、交配、実験を行なった。

自発運動モデル

Running wheel を装着したケージ (140 mm in diameter, MELQUEST, Toyama, Japan) で二週間飼育することで自発運動モデルとした (+Ex 群)。また、通常のケージで飼育した群をコントロール群とした (-Ex 群)。走行距離は、CNT-10 (MELQUEST)にて計測した。また、全てのマウス群にチミジンアナログである EdU を運動期間処置する (-Ex 群にも処置)ことで、増殖筋サテライト細胞および、筋サテライト細胞由来筋核を EdU で標識した。

筋サテライト細胞の増殖・活性化

各群のマウスより長趾伸筋 (EDL) を単離し、一本の筋線維上の筋サテライト細胞数を計測した。1 匹のマウスあたり 20 本以上の筋線維を測定し、平均値を求めた。また、各群のマウスより前脛骨筋 (TA) を単離・固定し、切片を作成後に染色することで、EdU 陽性筋サテライト細胞数や、EdU 陽性筋核数を定量解析した。

定量的・統計解析

Hybrid Cell count や Image J などを用いて、取得した画像解析を実施した。2 群間の統計的有意性は *Student's t-test* により評価した。2 群以上の比較では、*non-repeated measures analysis of variance (ANOVA)* の *Tukey's multiple comparisons test* を用いた。有意水準を 5% ($p < 0.05$) とした。統計解析とグラフ化はいずれも GraphPad Prism10 (GraphPad Software) を用いて行った。

結果

1. 走行距離・負荷筋

cKO マウスと cDKO マウス間に二週間の総走行距離には違いがなかった。以上の結果より、両グループ間で運動能力に違いがないことが明らかとなった。

2. 運動負荷のかからない筋肉での筋サテライト細胞の増殖 I

Running wheel による exercise において、EDL や TA の筋サテライト細胞は増殖しないことが知られている。実際に我々の検討においても+Ex 群の

C57BL/6 マウスの EDL や TA では筋サテライト細胞の増殖や EdU 陽性の筋線維核は -Ex 群と違いがなかった。しかし、cKO マウスでは、EDL より単離した筋線維上で筋サテライト細胞の増殖が観察されていた。カルシトニン受容体シグナルは筋サテライト細胞の静止期維持に働き、-Ex 群ではその数が減少する。そのため、運動による物理的な負荷ではなく、運動により増加することが知られているエキソカインが cKO マウスの EDL や TA の筋サテライト細胞の増殖に寄与している可能性が考えられた。そこで、代表的なエキソカインである IL-6 の受容体の中で、共通受容体である gp130 を cKO マウスで欠損させたマウスを解析した。その結果、cKO でみられた単離筋線維上での筋サテライト細胞の増殖は cDKO では抑制されていた。

3. 運動負荷のかからない筋肉での筋サテライト細胞の増殖 II

前脛骨筋を用いた組織学的な解析においても、cKO では EdU 陽性の筋線維核や筋サテライト細胞が、運動をした場合においてのみ観察されるが、gp130 を同時に欠損させた cDKO においては、これら EdU 陽性核や細胞が有意に低下していた。

考察

コントロールマウスでは EDL や TA などの運動により負荷が増加しない筋肉内で筋サテライトが増殖しない理由は、運動依存的な因子が存在しても、カルシトニン受容体からのシグナルにより静止期を維持できるためと考えられる。逆に運動負荷のかかる筋肉内で筋サテライト細胞が増殖するためには、カルシトニン受容体シグナルの抑制が必要であり、実際に以前の研究により下流シグナルを増加させることで、運動負荷依存的な筋サテライト細胞の増殖が完全に抑制できることを観察している。また、gp130 の欠損により cKO で見られた筋サテライト細胞の増殖を抑制できたことは、カルシトニン受容体発現抑制と運動依存的な gp130 のわずかに二つのシグナル経路の制御で、全身性の MuSC の増殖誘導が可能であることを示唆しており、今後筋ジストロフィーモデルマウスを用いた検討を行う予定である。

・カルシトニン受容体シグナルの抑制と、gp130 の活性化により、人工的に全身の筋サテライト細胞を増殖させることは可能である。

参考文献

- 1 Kaneshige A, Kaji T, Zhang L et al. Relayed signaling between mesenchymal progenitors and muscle stem cells ensures adaptive stem cell response to increased mechanical load. *Cell Stem Cell* 2022;29(2):265-280 e266.
- 2 Zhang L, Saito H, Higashimoto T et al. Regulation of muscle hypertrophy through granulin: Relayed communication among mesenchymal progenitors, macrophages, and satellite cells. *Cell reports* 2024;43(4):114052.
- 3 Fukada SI, Higashimoto T, Kaneshige A. Differences in muscle satellite cell dynamics during muscle hypertrophy and regeneration. *Skeletal muscle* 2022;12(1):17.
- 4 Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T et al. Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell reports* 2015;13(2):302-314.
- 5 Zhang L, Noguchi YT, Nakayama H et al. The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells. *Cell reports* 2019;29(8):2154-2163 e2155.
- 6 Baghdadi MB, Castel D, Machado L et al. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature* 2018;557:714-718.

結論

筋組織を標的化する核酸医薬デリバリーシステムの開発

宮田 完二郎、内藤 瑞、谷脇 香

東京大学大学院工学系研究科
マテリアル工学専攻/バイオエンジニアリング専攻

緒言

筋ジストロフィーに代表される難治性筋疾患の治療に向けては、疾患原因遺伝子の発現を選択的に調節することができる核酸医薬に期待が寄せられている。その一方で、核酸医薬などの中分子医薬は、血流を通じて腎臓から速やかに排泄されるため、筋組織への集積効率が非常に低いことが課題となっている。

本分担研究では、核酸医薬を効率良く筋組織に集積させることを目指し、核酸医薬デリバリーシステム(ナノ医薬)の研究開発に取り組んだ。前年度までに、サイズが 10–20 nm の高分子材料は全身投与を介して効率良く筋組織に集積することを明らかにした^[1]。そこで本年度は、DNA/RNA ハイブリッドからなるヘテロ核酸(HDO)の筋組織デリバリーを実施した。

方法

ユニットポリイオンコンプレックスの調製

約 18 nm 径のサイズを有するナノ医薬として、ユニットポリイオンコンプレックス(uPIC)を調製した。具体的には、2 分岐ポリエチレングリコールとポリリシンの Y 字型ブロック共重合体(YBC)と HDO を緩衝液中で混合することで調製した。この際、混合比(YBC のアミノ基/HDO のリン酸基)を 0, 1, 2 と変え、その寄与を評価することとした。

HDO 搭載 uPIC の物性評価

アガロースゲル電気泳動、動的光散乱測定、および電気泳動光散乱により、uPIC 中への HDO の内包挙動、uPIC の粒径、および uPIC の表面(ゼータ)電位をそれぞれ測定した。

HDO 搭載 uPIC の血中動態評価

蛍光標識 HDO を用いて uPIC を調製し、筋ジストロフィーモデル(*mdx*)マウス尾静脈への投与後、耳

介の血管を共焦点レーザー走査顕微鏡により経時的に観察することで、uPIC の血中動態を観測した。また、同様の手法に基づいて大腿四頭筋組織を観察することで、筋組織への移行性を評価した。さらに、本実験の比較対象として、脂質ナノ粒子(LNP)を調製し、同様の評価を実施した。

結果と考察

アガロースゲル電気泳動の結果から、混合比 1 以上では HDO の uPIC 内包率は 100%近いことが確認された。また、uPIC の粒径とゼータ電位は、~18 nm と~0 mV であった。従って、想定通り 20 nm 以下のサイズであること、および表面は非イオン性かつ親水性のポリエチレングリコール鎖で覆われていることが示唆された。

mdx マウスにおける血中動態評価を通じて、混合比が 0, 1, 2 と増加するに伴い、血中滞留性が劇的に増加することが明らかになった。Area under curve (AUC)換算では、HDO 単体(混合比 0)と比べ、混合比 2 の uPIC は 20 倍大きい値を示した。この値は、LNP の 5 倍であったことから、既存のナノ医薬と比べても高い値であることがわかる。次いで、骨格筋(大腿四頭筋)への移行性に関しては、uPIC は AUC 換算で HDO 単体の 7.5 倍という優れた筋組織集積性を示すことが明らかになった。一方、LNP に関しては、血中 AUC は HDO 単体よりも 4 倍大きかったのに対し、骨格筋 AUC は HDO 単体よりも低い値を示した。これは、LNP のサイズが ~100 nm と大きく、骨格筋組織の毛細血管から組織側に漏出できなかったためと考察される。

以上、本研究を通じて、~18 nm サイズの極小ナノ医薬 uPIC は、筋組織への核酸医薬デリバリーに有望であることが示唆された。

参考文献

[1] M. Naito, Y. Aoki, K. Miyata, et al., Size-tunable PEG-grafted copolymers as a polymeric nanoruler for passive targeting muscle tissues. *J. Control. Release* 347 607–614 (2022).

研究課題名：疾患モデルを駆使した筋ジストロフィーの治療法開発

分担研究課題名：廃用性筋萎縮の制御因子解析と創薬応用

東京農工大学大学院 工学府
生命工学専攻 稲田 全規

緒言

本研究の目的は、廃用性筋萎縮におけるプロスタグランジンファミリー因子の機能を解析し、筋ジストロフィーやサルコペニアなどの筋萎縮性疾患の治療法の解明につなげることである。プロスタグランジンは主に14種からなる炎症性メディエーターで、筋疾患への関与が示唆されている。そこで、本課題では筋萎縮における5種の代表的なプロスタグランジンであるPGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α の質量分析技術を用いた産生動態と機能解析を行い、筋萎縮の主因となっているプロスタグランジンを明らかにする。さらに、遺伝子の網羅解析を行い、筋萎縮性疾患の治療薬開発につなげる。

本年度は、筋組織におけるプロスタグランジンの解析と機能性実験を実施した。

検討項目：

筋組織におけるプロスタグランジンの定性解析

プロスタグランジン(PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α)の検出法について、プロスタグランジンのイオン化最適条件の決定と質量分析イメージングへの適用条件を決定した。この測定方法を用いて、筋組織におけるプロスタグランジンの分布を解析するため、筋サンプルの最適化を実施した。スプレーニング検討、イオン化効率の検討、質量分析イメージング装置を用い、筋組織において産生されるプロスタグランジンとして、PGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2 α の産生を検討した。

筋組織におけるプロスタグランジンの定量解析

酵素抗体法と質量分析を用いた筋組織におけるプロスタグランジンの解析と機能性実験

を実施した。マウス下肢骨格筋を用い、定量的解析を行った。今年度は最適な条件検討を進め、ELISAとの測定結果の融合をはかり、筋組織におけるプロスタグランジンの解析基盤を構築した。このうち、数種のプロスタグランジンを用いた筋細胞分化の機能性実験を行い、RNA-seqによる廃用性筋萎縮の関連遺伝子の網羅解析への予備検討をあわせて行った。

結論

本研究課題では、筋萎縮におけるPGE2, PGD2, PGJ2, PGI2, PGF2ファミリー因子の産生動態を質量分析イメージング、LC-MS質量分析、酵素抗体法による組織動態を解析し、どのプロスタグランジンが筋萎縮の主因となっているかを動物試験および細胞機能実験と共に検討してゆく。今年度は、筋組織におけるプロスタグランジンの検出ならびに産生動態を解析した。さらに、これらプロスタグランジンを用いて、筋細胞分化の機能性実験を実施した。今後はRNA-seqによる廃用性筋萎縮の関連遺伝子の網羅解析をあわせて進め、筋萎縮性疾患の治療につながる分子標的を解析し、将来の治療薬の開発につなげたい。

参考文献

1. Urano K, Tanaka Y, Tominari T, Takatoya M, Arai D, Miyata S, Matsumoto C, Miyaura C, Numabe Y, Itoh Y, Hirata M, Inada M. The stiffness and collagen control differentiation of osteoclasts with an altered expression of c-Src in podosome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 16:704:149636.
2. Tominari T, Takatoya M, Matsubara T, Matsunobe M, Arai D, Matsumoto C, Hirata M, Yoshinouchi S, Miyaura C, Itoh Y, Komaki H, Takeda S, Aoki Y, Inada M. Establishment of a Triple Quadrupole HPLC-MS Quantitation Method for Dystrophin Protein in Mouse and Human Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25, 303.

筋ジストロフィーに対する遺伝子細胞治療法の社会実装に向けた取り組み

分担研究者

氏名（所属施設） 岡田 尚巳
（所属・職名） 東京大学医科学研究所 遺伝子・細胞治療センター 教授

諸言

間葉系間質細胞 (Multipotent mesenchymal stromal cells : MSCs) は、移植時の拒絶反応が少なく、炎症組織に集積して抗炎症作用を示すため、本邦においても、ステロイド抵抗性移植片対宿主病に対する細胞性医薬品として既に販売承認されている。しかし、筋疾患における MSCs の社会実装に向けては、移植細胞による作用機序の曖昧性や病態評価系の課題が残されている。

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の根本治療としてジストロフィン産生を目的とする遺伝子編集や遺伝子治療の開発が進められる一方で、慢性炎症は筋機能障害を誘導する要因の一つであり、炎症制御および組織保護効果が期待できる MSCs による細胞治療が注目される。

これまでに、MSCs を用いた DMD への治療アプローチとしては、臍帯由来 MSCs の臨床試験が海外で実施されている。一部の患者における治療効果が報告されているものの、効果の持続性や治療標的は未確認である。我々はこれまでに、DMD モデル動物を用いた MSCs による運動機能の維持効果^{1),2)}、MSCs の免疫制御能を活用したマイクロジストロフィン発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの有効性³⁾ について報告した。

本課題では、DMD に対する遺伝子・細胞治療法の本格的な社会実装を目指し、(1) MSCs を用いた抗炎症療法、(2) 根本治療として AAV ベクターを用いた遺伝子治療、(3) MSCs と遺伝子治療の併用療法について、モデル動物を用いた評価を

実施する。特に、全身反復投与による抗炎症作用、筋保護効果、さらに運動機能の改善における有効性評価を実施することで、これまでに十分に解析されていない作用機序や新たな治療評価の有用なバロメーターとなる項目を検討する。

方法と結果

MSCs を投与した DMD モデル *mdx* マウスを用いて、骨格筋組織における炎症制御効果を検証した。*mdx* マウス骨格筋は、炎症性 Mφ などの細胞浸潤、壊死線維、大小不同の筋線維などの病理所見を示す一方、MSCs 投与 *mdx* マウスは細胞浸潤領域が限定的であり、筋壊死を経て再生した中心核線維数が減少し、病理組織学的に軽症の傾向を示した。また、若齢の *mdx* マウスでは、広範囲な細胞核浸潤領域の Mφ (F4/80 陽性) の大部分が炎症性 Mφ であると示唆されたが、MSCs 投与マウスでは、Mφ の多くが炎症抑制性 M2Mφ (CD206 陽性) であることが確認された。

さらに、骨格筋組織におけるマイオカイン発現解析を行い、MSCs 投与マウスは非投与マウスと比べて、細胞増殖や抗アポトーシスに関与するケモカイン tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)、および IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) の発現が増加していた。

考察

マウス骨格筋を用いた組織解析の結果、MSCs 投与による M1 および M2Mφ のポピュレーション変化を伴った炎症制御効果、マイオカインの微小環境の変動が示唆された。本結果より、我々は MSCs

投与による病理所見の改善効果が炎症病態の緩和によるものと推察した。その効果は、MSCs 分泌因子や筋細胞との相互作用を介した炎症制御・組織保護につながることを考えられる。

今後、MSCs 投与組織における微小環境の変化や作用標的を精査することで、MSCs の炎症制御作用・組織保護における機序解明が期待される。さらに、遺伝子治療との併用療法の可能性について検討する。

結論

MSCs 投与による DMD 骨格筋組織における M1 および M2Mφ のポピュレーション変化を伴った炎症制御作用、炎症制御・組織修復に関連するマイオカインの微小環境の変動が明らかとなった⁴⁾。これにより、MSCs を用いた筋ジストロフィーに対する炎症制御療法の推進が期待された。

参考文献

- 1) Nitahara-Kasahara Y, Kuraoka M, Oda Y, Hayashita-Kinoh H, Takeda S, Okada T. Enhanced cell survival and therapeutic benefits of IL-10 expressing multipotent mesenchymal stromal cells for muscular dystrophy. *Stem Cell Research & Therapy*. Vol. 12, No.1, 105-119. 2021.
- 2) Nitahara-Kasahara Y, Kuraoka M, Herrera Guillermo P, Hayashita-Kinoh H, Maruoka Y, Nakamura-Takahasi A, Kimura K, Takeda S, Okada T. Dental pulp stem cells can improve muscle dysfunction in animal models of Duchenne muscular dystrophy. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021; 12(1):78-94.
- 3) Hayashita-Kinoh H, Herrera Guillermo P, Nitahara-Kasahara Y, Kuraoka M, Okada H, Takeda S, Okada T. Improved

transduction of canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9-microdystrophin via multipotent MSC pretreatment. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020; 20:133-141.

- 4) Nitahara-Kasahara Y, Nakayama S, Kimura K, Yamaguchi S, Kakiuchi Y, Nito C, Hayashi M, Nakaishi T, Ueda Y, Okada T. Immunomodulatory amnion mesenchymal stem cells preserve muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Stem Cell Research & Therapy*. 2023; 14(1):108-128.

iPS 細胞由来骨格筋幹細胞による細胞治療の開発

分担研究者 櫻井 英俊

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門

緒 言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対し、骨格筋幹細胞であるサテライト細胞を用いた細胞移植治療法は、モデルマウスでは治療効果を発揮している。しかしながらヒトでは治療に十分な量のサテライト細胞を得ることは困難である。そこで iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導し移植細胞のソースとすることで、再生医療製剤の開発も可能であると期待されている。我々はヒト iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導し、筋再生能を持つことを明らかにしたが、目的外細胞の混入により移植後に線維化や脂肪化といった重篤な副作用が生じることが明らかになった。本研究では目的外細胞を完全に除去する方法を確立し、安全な移植法を確立することを目指す。

方 法

健常者 iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導し、近年開発された microRNA スイッチシステム¹⁾を用いて分化細胞の中から骨格筋幹細胞を純化可能であるか評価する。具体的には骨格筋特異的 microRNA に応答したオフスイッチに Barnase という RNase を発現させることで非筋細胞を死滅させ、さらにその効果を増強させるために、骨格筋特異的 microRNA に応答したオンスイッチに Barstar と呼ばれる Barnase の阻害分子を強制発現させる。純化効率を免疫染色やフローサイトメトリーにて評価する。

結 果

骨格筋幹細胞マーカーである PAX7 に Venus をノックインしたレポーター iPS 細胞を分化誘導し、分化 70 日目以降でシングルセルに細胞を分

散し、FGFR4 の抗体染色も実施して FACS によりソーティングした。得られた PAX7+FGFR4+細胞群を骨格筋幹細胞、PAX7-FGFR4+細胞群を非筋細胞と定義して RNA を抽出し microRNA sequence にて網羅的発現解析を行った。18 種の候補が同定され、発現量を検証したところ、microRNA-206(miR-206) が骨格筋特異的 microRNA として同定された。共同研究者の齊藤博英博士らに miR-206 応答性スイッチ mRNA を作製していただいた。次に健常者由来 iPS 細胞 414C2 を骨格筋幹細胞へ分化誘導し、分化 70 日目以降でシングルセルに分散しリボフエクタミン mRNAmax を用いて miR-206 応答スイッチ mRNA をトランスフェクションした。コントロールとして、蛍光蛋白発現 mRNA を用いた。遺伝子導入後 2 日目よりスイッチ mRNA 導入細胞では細胞死が顕著となり、導入後 21 日目で免疫染色により骨格筋幹細胞の純度が上がっていた。

考 察

本年度は骨格筋特異的 microRNA-206 に応答する microRNA スイッチシステムの有用性を示唆するデータが得られた。今後は純化度を定量評価するため PAX7 レポーター iPS 細胞由来の骨格筋幹細胞を用いて解析を進める。

結 論

骨格筋特異的 microRNA-206 を用いたスイッチシステムは iPS 細胞由来骨格筋幹細胞分化系への導入により効果を発揮する。

参考文献

- 1) Fujita et al. A versatile and robust cell purification system with an RNA-only circuit composed of microRNA-responsive ON and OFF switches Science Advances. 8, eabj1793(2022)

糖鎖異常型筋ジストロフィーモデルマウスを用いた分子病態機構の解明と治療法開発

金川 基

愛媛大学大学院医学系研究科

緒言

福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) は、重度の筋ジストロフィーに加え、脳奇形や精神発達遅滞等の中枢神経障害、心筋症を伴う常染色体性潜性遺伝性疾患で、フクチン遺伝子の変異によって発症する。FCMD では基底膜ラミニンの受容体であるジストログリカン (DG) の糖鎖に異常が生じている。同様の糖鎖異常を示す筋ジストロフィーも世界的にみられ、DG 異常症と総称される。分担者らは、DG 糖鎖にはリビトールリン酸という修飾体が含まれており、フクチンは糖鎖にリビトールリン酸を組み込む酵素、DG 異常症遺伝子のひとつ ISPD はリビトールリン酸の糖鎖前駆体 CDP-リビトールの合成酵素であることを解明した(1)。つまり、リビトールリン酸糖鎖の欠落によって、ラミニン結合性の糖鎖が伸長できず、基底膜-細胞膜の連携が破綻することが発症要因となる。本分担課題においては、糖鎖修飾の分子機序を解明し、それに基づく糖鎖異常の解消を基盤とする DG 異常症の治療法を開発する。

方法

DG 異常症、特に ISPD 欠損型に対する治療法の開発を目指し、ISPD 酵素反応に基づく糖鎖補充療法の基礎研究を実施する。具体的には、①ISPD 欠損および点変異マウスを作出し、②CDP-リビトール補充療法およびリビトール補充療法の有効性を明らかにする。ISPD はリビトール 5 リン酸から CDP-リビトールを合成する酵素である。従って、ISPD 欠損型には CDP-リビトールの補充が有効と考えられる。また、リビトール 5 リン酸への親和性が低下するような病原性変異体では、リビトール 5 リン酸の投与も有効と考えられる。本計画では、ISPD の骨格筋特異的 conditional KO (cKO) マウスと点変異のゲノム編集マウスを作出し、その病態を解析する。次いで、これらのマウスへの CDP-リビトールやリビトール 5 リン酸の投与で治療効果が認められるか検証する。

結果

これまで骨格筋選択的な ISPD-cKO マウスを用いてプロドラッグ化 CDP-リビトール補充療法の有効性を提唱してきた(2)。現在プロドラッグ化合物の更なる改良を進めている。また、ISPD 点変異マウスの作出を終え、病態解析とリビトール投与を開始したところである。予備的データからはリビトール投与によって筋力が改善していることが示唆される。

次に ISPD の基質であるリビトール 5 リン酸の生合成経路の特定を試みた。LC-MS を利用した組織中の CDP-リビトールおよびリビトール 5 リン酸の高感度高精度定量測定法を活用し、アルデヒド基とケト基の還元に関連する酵素群 Aldo-keto reductase(AKR) family のリビトール 5 リン酸生合成に関わる役割を検討した。その結果、AKR1B1 がリボースをリビトールへ還元し、リン酸化酵素がリビトールをリン酸化してリビトール 5 リン酸となる経路が CDP-リビトールの産生を担っていることが示された(3)。

考察

CDP-リビトール補充療法はどのような ISPD 変異でも適応可能であり、フクチン (福山型) や FKRP (肢帯型 2I) など CDP-リビトールを基質として用いる酵素に対しても、変異の種によっては残存酵素活性を増強させ治療につながる事が考えられる。ただし、プロドラッグとしては更なる改良を加え、低用量で治療効果を発揮する誘導体を開発する必要がある。一方で、CDP-リビトールの材料となるリビトールの補充療法は ISPD 点変異の症例にくわえ、FKRP 変異型の DG 異常症でも有効であることが示唆されており、今後の臨床研究の展開に興味もたれる。また、CDP-リビトール補充療法およびリビトール補充療法のいずれの作用機序を理解するためにも、CDP-リビトールの生合成・代謝経路の解明が急務であったが、本研究によってリボースから CDP-リビトール生合成に関わる代謝経路が明らかになったことは、治療法の Mechanism of Action の解明に繋がる重要な知見と考えられる。

結論

ISPD 欠損型筋ジストロフィーに対するプロドラッグ化 CDP-リビトール補充療法およびリビトール補充療法の有効性を実証した。CDP-リビトールの生合成に関わる酵素として AKR1B を同定し、CDP-リ

ビトールおよびリビトール補充療法の開発に重要な学術的知見を得た。

参考文献

- (1) Kanagawa, M., et al. Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep.* 14, 2209-2223 (2016).
- (2) Tokuoka, et al. CDP-ribitol prodrug treatment ameliorates ISPD-deficient muscular dystrophy mouse model. *Nat Commun.* 13, 1847 (2022)
- (3) Hoshino, et al. Endogenous reductase activities for the generation of ribitol-phosphate, a CDP-ribitol precursor, in mammals. *J Biochem. Accepted* doi: 10.1093/jb/mvad115.

ジストロフィン欠損筋に対する等尺性運動の効果

山田 崇史
札幌医科大学

緒言

ジストロフィン欠損筋は、伸張性収縮による損傷を受けやすい特徴を有する。一方、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）患者の運動機能を維持する上で、安全かつ効果的な運動処方の実現に対する期待は大きい。そこで本研究では、DMD モデル（mdx52）マウスを用い、損傷性の低い等尺性トレーニング（ISO）が DMD 筋の病態および機能に及ぼす影響を検討した。

方法

15-22 週齢の WT および mdx52 マウスの下腿三頭筋に対し、麻酔下にて神経-筋電気刺激（NMES）を用い、ISO（45 V, 100 Hz, 0.25 秒刺激/0.25 秒休息, 60 収縮, 6 セット, セット間のインターバル 4 分）を 2 日に 1 回の頻度で 4 週間負荷した(Yamada *et al.*, 2021; Yamada *et al.*, 2022)。最終 ISO 負荷の 2 日後に NMES を用いて下腿三頭筋の疲労耐性を測定し、その翌日に足底筋および腓腹筋を採取し解析に供した。なお、本研究は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け実施した（承認番号：20-084_21-062_21-013_23-020）。

結果

mdx52 マウスの非 ISO 側では、Evans blue dye 陽性の損傷線維が集団で観察された。また、それは慢性的な mTOR 経路の活性化（Akt のリン酸化）、ミトコンドリア関連因子の低下（PGC-1 α 発現量およびクエン酸合成酵素活性の減少）、オートファジーフラックスの低下（p62 発現量の増加, LC3BII/I の減少）、マクロファージの増加（CD68 および CD206 発現量の増加）を伴っていた。一方、4 週間の ISO は mdx52 筋におけるこれらの変化をすべて改善するとともに、筋持久力を顕著に向上させた。

考察

近年、ジストロフィン欠損筋の病態機序に、オートファジー機能の低下が関与することが報告され注

目を集めている。本研究では、運動がオートファジーの活性化因子であること、また、ジストロフィン欠損筋は ISO では損傷を起こしにくいことに着目し、ISO がジストロフィン欠損筋の病態を改善するかどうかを検討した。驚くべきことに、4 週間の ISO は、mdx マウス骨格筋のオートファジー機能を正常化するとともに、筋病変ならびに筋持久力を顕著に改善した。先行研究において、ジストロフィン欠損筋では、慢性的な mTOR 経路の活性化がオートファジー障害を引き起こすこと、一方、PGC-1 α は mTOR 経路に拮抗して作用することが報告されている。したがって、ISO によるオートファジー機能の正常化には、PGC-1 α 発現量の増大による mTOR 経路の不活性化が関与すると考えられる。

結論

ISO は、PGC-1 α による mTOR 経路の抑制を介したオートファジー機能の正常化ならびにミトコンドリア機能の向上により、ジストロフィン欠損筋の病態を改善することが示唆された。これらの知見は、DMD 患者に対する適切な運動処方を実現するために、ISO が活用できる可能性を示すものである。

参考文献

- Yamada T, Ashida Y, Tamai K, Kimura I, Yamauchi N, Naito A, Tokuda N, Westerblad H, Andersson DC & Himori K. (2022). Improved skeletal muscle fatigue resistance in experimental autoimmune myositis mice following high-intensity interval training. *Arthritis Res Ther* **24**, 156.
- Yamada T, Kimura I, Ashida Y, Tamai K, Fusagawa H, Tohse N, Westerblad H, Andersson DC & Sato T. (2021). Larger improvements in fatigue resistance and mitochondrial function with high- than with low-intensity contractions during interval training of mouse skeletal muscle. *Faseb j* **35**, e21988.

ドナー由来 Muse 細胞の点滴による筋ジストロフィー治療戦略

国立大学法人 東北大学大学院医学系研究科
出澤 真理

緒言

ドナー Muse 細胞は 10 万人に 1 人の確率でしか適合しない HLA 型や免疫抑制剤の投与なしで患者に点滴投与が可能である。ドナー Muse 細胞が DMD 患者の変性筋組織に生着し、ジストロフィンを発現する機能的な筋線維に分化することで、筋組織の変性治療だけでなく、喪失した筋線維を補完することも期待される。また、骨髄への Muse 細胞移植は他に類例がなく、DMD の慢性筋病態を反復投与の必要なく改善させることができると考える。これらにより、DMD 患者に対する新規細胞治療法の研究基盤を確立することを目指す。

方法

Muse 細胞移植による変性筋組織の治療効果を解明するため、マウス (B6 や mdx52 マウス) の骨格筋に cardiotoxin (CTX) 等の局所ないし静脈投与を行い、ヒト骨髄由来 Muse 細胞を投与して経時的に筋病態解析を行う。比較群として、MSC の投与群を用意する。中心核線維数、筋線維化は Sirius Red 染色、筋壊死・炎症サイトカイン測定、神経筋接合部 (NMJ) の構成等を評価する。さらに Muse 細胞を骨髄に移植し、Muse 細胞単回投与によって慢性的な筋変性への効果を検討する。野生型 C57BL/6 マウスに放射線暴露による骨髄損傷を与え、ヒト Muse 細胞の局所ないし静脈投与による骨髄移植を行い筋変性への Muse 細胞動員、治療効果を検討する。

結果

細胞は傷害を受けると細胞膜の外膜を構成するスフィンゴシンが転換され、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) を警報として産生する。Muse 細胞は S1P receptor 2 を発現するため、点滴で投与すると傷害部位に選択的に遊走・集積することが可能である。全ての組織が細胞で出来ており、S1P は最も普遍性の高い傷害警報の一つである。このため Muse 細胞はどの組織であっても点滴投与で傷害部位に到達することができる (Yamada et al., 2018 *Cir Res*)。また Muse 細胞は独特の機構で分化することが明らかとなった。傷害細胞・死細胞の断片を貪食し、分化シグナルを再利用することで迅速に分化する。このため日単位でエラー無く

傷害・死細胞と同じ細胞種に分化することが可能であり、この機構によって組織を修復することが分かった (Wakao et al., 2022, *Cell Mol Life Sci*)。これまでの予備実験において、Cardiotoxin (CTX) により変性したマウス筋組織においてヒト Muse 細胞が Pax7 陽性、またはジストロフィン陽性の骨格筋細胞に分化することを見出している (Kuroda et al., *PNAS*. 2010)。

考察

これまでの予備実験において、Cardiotoxin (CTX) により変性したマウス筋組織においてヒト Muse 細胞が Pax7 陽性、またはジストロフィン陽性の骨格筋細胞に分化することを見出している (Kuroda et al., *PNAS*. 2010)。本研究では、DMD 筋組織において Muse 細胞がどのように変性した筋組織に生着し、機能性を持つ骨格筋に分化できるのか、ジストロフィンを発現するのか、Muse 細胞由来筋線維は正常な筋機能を示すのかなどを解明する。また慢性疾患は、徐々に組織破壊や荒廃が進んで行く。そのために頻回にドナー Muse 細胞を点滴投与することは負担である。この解決の一つとして生体にドナーの健常者 Muse 細胞が正着し、恒常的に健常 Muse 細胞が変性骨格筋を置き換えることができる方法を模索する。骨髄を一つのターゲットとして研究を進める。

結論

Muse 細胞の生体内でどのように「場の論理」に応じてエラーなく分化し、傷害細胞を置き換えるのか、その分化機構を解明した。また MSC と Muse 細胞の遺伝子発現やシグナル伝達系の違いも解明した。

参考文献

- Oguma Y, Alessio N, Aprile D, Dezawa M, Peluso G, Di Bernardo G, Galderisi U. Meta-analysis of senescent cell secretomes to identify common and specific features of the different senescent phenotypes: a tool for developing new senotherapeutics. *Cell Commun Signal*. 2023 Sep. 21(1):262. doi:10.1186/s12964-023-01280-4.
- Li G, Wakao S, Kitada M, Dezawa M. Tumor suppressor let-7 acts as a key regulator for pluripotency gene expression in Muse cells. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Jan 23; 81(1):54. doi:10.1007/s00018-023-05089-9.

エクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸のデータベース構築およびスキッピング予測に関する研究

奥野 恭史
理化学研究所

緒言

スプライシング制御（エクソンスキッピング）を利用した疾患の治療のためのアンチセンス核酸は、新しい創薬モダリティとして期待されている。スキップの対象とする mRNA 前駆体上のエクソンを、効率よくスキップさせるアンチセンス核酸の標的部位や長さは、通常、網羅的な実験によって決定されている。そこで、本研究では、この網羅的な実験による開発期間とコストの増大を抑制するため、高効率アンチセンス核酸のデザインを補助する計算ツールおよびデータベースを構築している。

結果

R5 年度には、予測モデルのアルゴリズムの再検討することで、モデルの計算速度および予測性能を向上させられることを示した（参考文献）。また、論文及び特許などの文献からエクソンスキッピングに関連する情報を収集およびマニュアルキュレーションを大規模に実施し、データベースに収載する遺伝子を

拡充し公開した（<https://eskip-finder.org>, 2024 年 3 月 22 日更新）（表）。

結論

本研究では、エクソンスキッピングのためのアンチセンス核酸データベースおよびアンチセンス核酸デザインのための予測ツールを公開した。現在もデータベースに収載すべき特許などの文献からの情報抽出を継続しており、より多様な遺伝子、スキップデータを今後公開する予定である。また、予測モデルに関しても、現在複数の遺伝子の情報を学習に取り込む試みを継続しており、予測モデルの多様な遺伝子への適用可能性の拡大を目指している。

参考文献

A Zhu, S Chiba, Y Shimizu, K Kunitake, Y Okuno, Y Aoki, T Yokota, Ensemble-Learning and Feature Selection Techniques for Enhanced Antisense Oligonucleotide Efficacy Prediction in Exon Skipping, *Pharmaceutics*, 15(7) 2023.

表. 公開したデータベースの遺伝子名およびエントリー数 (2024 年 3 月 22 日)

DMD	MSTN	DYSF	SCN1	COL7A1	LAMA2	MAPT	USH2A	DMPK
10653	819	112	143	223	25	18	10	48
MS4A2	ATM	ALK2/ACVR1	NF1	PMM2	NPC1	NF2	MLC1	MFSD8(CLN7)
6	4	4	19	1	1	1	1	2
H-RAS, K-RAS, N-RAS	ATN1	IL1RAP	ABCA4	AKR1A1	APP	GLDC	HTT	TBP
32	52	29	66	6	10	59	66	14
ATXN3	ATXN7	COL4A5	C5	CASK	CD44	CEP290	CFTR	DMD/MSTN
58	9	404	16	1	14	7	8	3
FBN1	GYS1	HNRNPH1	LMNA	LUC	PAH	SMN2	STAT3	TTN
20	10	3	10	28	17	8	10	10
SOD1	SRC1	MADD	SNAP25A	SNAP25B	IL12RB1	IL12RB2	IL12RB3	IL12RB4
9	2	1	1	1	1	1	1	1
IL12RB5	IL12RB6	IL12RB7	IL12RB8					
1	1	1	1					

福山型筋ジストロフィーの疾患モデル作成と機能評価

池田真理子
藤田医科大学病院
臨床遺伝学

緒言

FCMD は本邦に患者の多い重篤な遺伝性難病である。乳幼児時期より発症する重度の筋ジストロフィーに加え・網膜剥離・白内障などの眼症状、胎内発症する滑脳症、てんかん、知的障害など重度な神経症状も併発する。責任遺伝子 FKTN は α ジストログリカンの糖鎖転移酵素であり、標的遺伝子 α DG タンパク質上の糖鎖を付加する。FCMD ではその糖鎖欠損が病態である。モデルマウスでは特に骨格筋や中枢症状が軽く、治療薬の効果の評価ができない。申請者はこれまで FCMD のアンチセンス核酸の治療法開発などにかかわってきた。福山型筋ジストロフィー (FCMD) の病態解明と、先行研究において革新的な薬効機序が示唆されている塩基性環状低分子化合物 Mn007 の創薬開発の実現を目指し、患者由来 iPSCs を駆使して、動物モデルでは再現しえなかった病態を本邦で開発されたヒト三次元培養技術法を応用し再現し、低分子化合物の薬効機序を解明しその効果を評価する。

方法

- 1 Mn007 のマトリグリカン伸長に対するアッセイ系を作成し、糖鎖伸長を評価する
- 2 Mn007 を大脳オルガノイドに投与し、糖鎖の変化を免疫染色で検討する
- 3 single cell RNA sequencing を行い大脳オルガノイドでの遺伝子発現の変化を検討し標的分子を同定する
- 4 Mn007 の薬効機序を解明するため、Mn007 の凝集での効果検討及び DNase 分解阻害について検討する

結果

- 1 マトリグリカン伸長アッセイにより、Mn007 はその濃度依存性にマトリグリカン糖鎖が付加されることが明らかになった。
- 2 大脳オルガノイドへの Mn007 投与においても濃度依存性に糖鎖シグナルの回復が示

唆された。

3 single cell RNA sequencing を大脳オルガノイド day 60, 130 の 2 ポイントで検討した。結果 day 60 では疾患と対照で有意な差がみられる遺伝子群は少なく、一方グリオーシスの進行した 130 日目では抑制性ニューロンの挙動の変化がみられた。

4 Mn007 は DNA 分解酵素を阻害することが実験的に証明されている。本要素と Mn007 の α DG 糖鎖伸長の関係はわかっていない。Mn007 の DNase 阻害効果により、人食いバクテリアである劇症型溶連菌の感染を好中球レベルで阻止できるかを検討した

考察

Mn007 のアッセイ系の確立、大脳オルガノイドの遺伝子発現解析や Mn007 による糖鎖回復を検討した。Mn007 は大脳オルガノイドでの効果を検討するのに良いツールである。アッセイ系により濃度や効果がより詳細に検討できるようになったので、今後は vivo での検討も行いたい。一方で Mn007 の毒性や vivo 投与における消化管吸収での検討も必要と考えた。

結論

Mn007 の新しい機能やその評価方法の確立を行った。大脳オルガノイドを用いることでマウスなどの疾患モデルでは表現できない脳表での糖鎖付加の検討が可能であると考えた。scRNA の挙動の検討や、アッセイ系について、論文執筆を準備中である。また、あらたに福山型重症型に対する治療法として核酸を用いたエクソンスキップ法が有効であることを 2022 年に報告した。本治療法においても大脳オルガノイドを用いた検討が可能であり、来年度にその検討を行うことで治療臨界期の検討ができると考えている。

参考文献

1. Taniguchi-Ikeda M, Koyanagi-Aoi M, Maruyama T, Takaori T, Hosoya A, Tezuka H, Nagase S, Ishihara T, Kadoshima T, Muguruma K, Ishigaki K, Sakurai K, Mizoguchi A, Novitch BG, Toda T, Watanabe M, and Aoi T. Restoration of the defect in radial glial fiber migration and cortical plate organization in a brain organoid model

- of Fukuyama muscular dystrophy.
iScience 2021;24(10):103140.
2. Enkhjargal S, Sugahara K, Khaledian B, Nagasaka M, Inagaki H, Kurahashi H, Koshimizu H, Toda T, and Taniguchi-Ikeda M. Antisense oligonucleotide induced pseudoexon skipping and restoration of functional protein for Fukuyama muscular dystrophy caused by a deep-intronic variant. Hum. Mol. Genet. 2022 ; 32(8) : 13011312 .
 3. K. Morita, T. Moriwaki, S. Habe, M. Taniguchi-Ikeda, T. Hasegawa, Y. Minato, T. Aoi, T. Maruyama, Molecular aggregation strategy for inhibiting DNase. JACS Au, accepted (2024).

DMD 遺伝子編集マイクロミニピッグの基礎情報及びキャリアメスブタの繁殖能力調査

分担研究者 大竹 正剛

所属 静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター 養豚・養鶏科

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の病態解明や治療方法開発にはモデル動物が不可欠であり、これまでマウスやイヌが使用されてきた。より解剖学・生理学的にヒトに近い特徴を有する動物種としてブタが有望視されてきたが、ES 細胞が樹立されていないブタでは遺伝子改変に体細胞クローン技術が必要なことや、ミニブタであっても成体で 100 kg 程に達すること(1)から取り扱いが煩雑である欠点があった。近年では遺伝子編集技術の確立によってブタも効率的に遺伝子改変が可能になりつつあり、筋ジストロフィーモデル作出も報告されてきたものの(2)、体格の課題は残されていた。

我々は、成体で 25 kg 程度とミニブタの中でも格段に小さく取り扱い易い実験用ミニブタである“マイクロミニピッグ(3)”を用いて、CRISPR/Cas9 システムによって、DMD 遺伝子のエクソン 23 を欠損させた遺伝子編集マイクロミニピッグ(以下、「MD ブタ」)を作出した。MD ブタは、他のミニブタより体格が小さいことに加え、長命である可能性とキャリアメスブタの有性生殖によって MD ブタを生産できることが特長として見出されつつある。しかし作出した MD ブタは外因性ストレスに敏感で取り扱いに注意が必要で基礎情報を得ることが難しい点や、キャリアメスブタの生産性が不明である点

に課題が残されている。そこで本研究では、MD ブタの取り扱い手技確立と MD ブタおよびキャリアメスブタの基礎情報を収集し、本動物の有用性と実用性について評価することを目的とする。

方法

1. MD ブタの基礎情報調査

(1) 取り扱いのための不動化の検討

MD ブタ (オス n=2) に塩酸メドミジン (0.1mg/kg) 及びミタゾラム (0.5 又は 1.0mg/kg)、または上記 2 種混合にケタミン (10 mg/kg) 若しくはアルファキサロン (5.0mg/kg) を加えて筋肉内投与した。投薬後、起立不能、眼瞼反射および指間刺激への反応消失にて鎮静および鎮痛を確認した。復帰は起立後の摂食行動にて確認した。

(2) 体格および血液生化学的性状調査

MD ブタ (オス n=2) 及び WT ブタ (オス n=1) を投薬による不動化後、体重、体長、体高、胸囲および血液生化学的性状 (AST、ALT、 γ -GT、LDH、CK、cTnT) を経時的に調査した。

2. キャリアメスブタの特性調査

(1) キャリアメスブタの繁殖能力調査

キャリアメスブタ (n=9) の繁殖成績 (妊娠期間、総産子数、生存産子数、死産数) を WT メスブタ (n=18) と比較した。またキャリアメスブタから得られた産子における変異型 DMD 遺伝子の出現状況および出生時体重との関係を解析した。

(2) キャリアメスブタの血清学的性状

キャリアメスブタ (n=7)、WT メスブタ (n=4) から採血し、血清学性状 (AST、ALT、 γ -GT、LDH、CK) を調査した。

結果

1. MDブタの基礎情報収集

(1) MD ブタは、いずれの投薬方法においても 5 分以内に鎮静が、20 分後には鎮痛が確認でき、その後の正常な復帰も確認した。なお復帰に 3 時間以上要する事例が認められた。

(2) MD ブタは、WT ブタに比較して体格がやや小さく推移したものの順調に成長していることが確認された(9 ヶ月齢の MD ブタは 11.5 kg と 10.7 kg、WT は 14.3 kg)。血清学的性状は、AST、ALT、LDH、CK、cTnT において WT ブタに比較し高値を示し、特に CK は 23,680~29,507 U/L と高値で推移した(WT ブタ ; 545~616 U/L)。

2. キャリアメスブタの特性調査

(1) キャリアメスブタは WT メスブタに比較して、妊娠期間に差は認められなかったが、総産子数(3.9 ± 1.6 頭 vs. 5.1 ± 2.0 頭; $p < 0.05$) や生存産子数 (3.0 ± 1.5 頭 vs. 4.0 ± 2.4 頭; $p < 0.01$) が有意に低かった。キャリアメスブタ由来の生存産子における変異型 DMD 遺伝子の出現頻度は 49.2%(32/65)であり、うちオスの比率は 50.0%(16/32)であった。死産産子 45 頭中 15 頭の変異型 DMD 遺伝子の出現頻度は 53.3%(8/15)であった。キャリアメス由来の生存産子における出生時体重は、変異型で有意に低かった(MD, 413.7 ± 94.5 g vs. WT, 360.3 ± 78.4 g; $p < 0.05$)。変異型における性別毎の出生時体重に有意な差はなかった。(2) キャリアメスブタにおける血清学的性状 (AST、ALT、 γ -GT、LDH、CK) は、WT メスブタと有意な差はなかった。

考察

これまで MD ブタは体重測定や移動のための保定のストレスによっても過敏に反応することがあったが、鎮静薬と麻酔薬の投与により不動化することで安定して処置でき正常に復帰させることが可能となった。投薬カクテルは塩酸メデトミジン (0.1mg/kg) とミタゾラム (1.0mg/kg) の組合せが最適と考えられたが、輸送等の継続的なストレスにはアルファキサロン等の追加や、早期復帰のため拮抗薬の選択も検討が必要であると考えられた。

MD ブタの血液性状は、AST、ALT、LDH、CK、cTnT において WT ブタに比較し高く推移することが確認され、ヒト DMD の特徴と酷似していた。

キャリアメスブタの繁殖能力は、生存産子数は低値を示し死産が多い傾向も確認されたが、生存産子における変異型 DMD 遺伝子の出現頻度は 1 : 1 であり性差もなかったことから、1 腹で 4 頭得られれば変異型が 1 頭は得られることが示唆された。DMD 遺伝子に変異を有する産子の出生時体重は WT ブタに比べ低値を示したが、その理由は今回の調査では不明であった。キャリアメスブタの血清学的性状は、Okamoto らが作出したキャリアメスブタでは CK 値で高値を示す個体を報告している (3) が、我々のキャリアメスブタは WT メスブタと差は認められなかった。

今回の調査は、傾向は明らかであったものの、今後引き続き例数を増やし、本モデル動物の特性解明に努めることとする。

参考文献

- (1) Ganderup NC, et al., *Int J Toxicol*. 2012.;31(6):507-28. PMID: 23134714

- (2) Echigoya Y, et al., *Int J Mol Sci* . 2021
Dec 2;22(23):13065. PMID: 34884867
- (3) Kaneko N, et al., *J Pharmacol Sci*. 2011;
115:112-4. PMID: 32272527
- (4) Okamoto K, et al. *Regen Ther*. 2023.
2023; 20:24:451-458.PMID: 37772130

一般社団法人 日本筋ジストロフィー協会 竹田 保
ホップ福祉問題研究所 中岡 良司

【研究の背景と目的】

日本筋ジストロフィー協会は1964年の設立以来、常に「根本治療法の確立」を最優先課題と考えてきた。そのような中で、2020年3月、我が国で初の筋ジス治療薬「ビルトラルセン」が承認されたが、2021年1月には治験を終えた他の筋ジス新薬は有効性が認められず承認されなかった。そこで、本協会は「希少疾患における新薬の承認手続きの改善」と「新薬開発における患者参画」への取り組みを強化することとした。

今回実施した調査においては、①今後の情報ツールとしてのインターネットに関して患者の利用環境および利用状況を把握すること、②患者が望む医療情報の入手方法、新薬への関心、どのような新薬の開発情報を知りたいか、誰の情報を信用しているか等を知ること、③ペイシエント・ジャーニーの観点から、希少疾病患者が抱える困難の所在と程度を明らかにすることを目的とした。

【調査の概要】

令和5年10月10日～11月10日、全国の筋ジス協会会員および北海道難病連所属の希少疾病患者を対象に無記名アンケート調査を実施した。回答人数は196人であった。調査内容は以下の通りである。

①属性(性別、年齢、住所、病名)、②インターネットの利用状況(利用できる情報機器、電子メールの所有、インターネットの利用目的)、③医療情報の入手(新薬への関心、新薬情報の入手方法、信頼できる情報の発信者、新薬開発段階への関心)、④ペイシエント・ジャーニーへの反応(検査と発症、診断、治療、社会の支援の各段階の経験)。

【調査結果】

① インターネットの利用状況に関しては、筋ジス患者のパソコンとスマホの所有率は8割以上で、電子メールの利用が最も多かった(図1)。また、電子メール、ホームページ閲覧、SNS、情報検索、商品の購入は半数以上が

利用していた。オンライン会議、金融取引、商品の購入、動画の視聴、電子申請など先進的利用も見られた。

② 医療情報の入手に関しては、筋ジス患者の9割が新薬開発に関心を持っていた。その情報をネットニュース、患者会の機関誌、テレビのニュースで受け取ることを期待している(図2)。なお、患者の97%が医者からの情報を信用すると回答している。

③ ペイシエント・ジャーニーによる分析に関しては、筋ジス患者においては「治療法不足」(90%)、「病院・医師不足」(86%)の困難が突出していた(図3)。また、「周囲の理解が得られない」(70%)も多かった。他の項目、「初期の検査」や「診断」における困難は50～60%にとどまっていた。

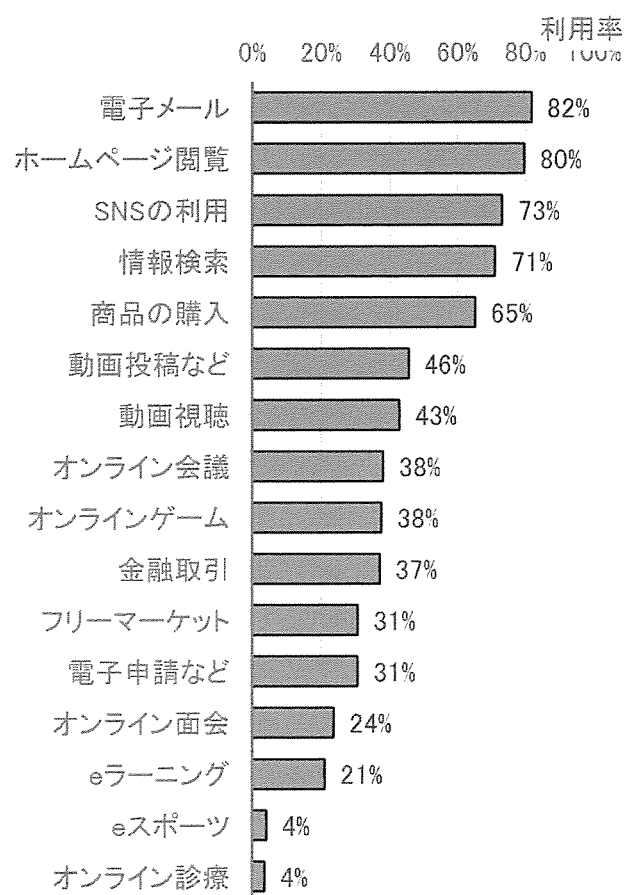


図1 インターネットの利用目的

【今後の課題】

筋ジス患者にとって、インターネットはもはや生活に不可欠な存在となっており、今後はインターネットを通じた医療情報の提供に積極的に取り組む必要がある。新たな治療薬への関心は極めて高く、新薬開発に関わる医療情報の発信を製薬会社および医師へ働きかける必要がある。また、ペイシェント・ジャーニーに基づく分析は患者が長い療養生活のどの過程でどの程度の困難を感じているかを数値化することが可能であり、有用な分析ツールとして今後の調査等に活用することが期待される。

参考文献

- 1)令和3年通信利用動向調査の結果:総務省、2021.8
- 2)新薬に関する意識調査:米国研究製薬工業協会(PhRMA)、2019.6
- 3)日本における希少疾患の課題:武田薬品工業株式会社、提言書、2020.4

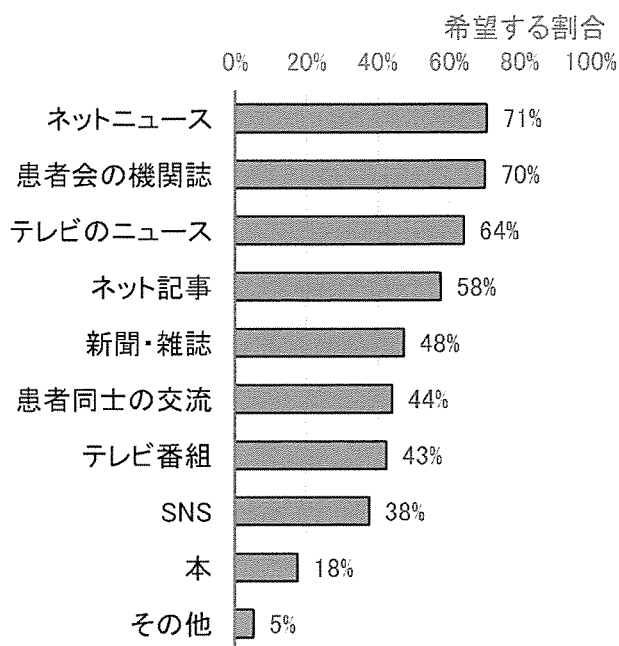


図2 希望する医療情報の入手方法

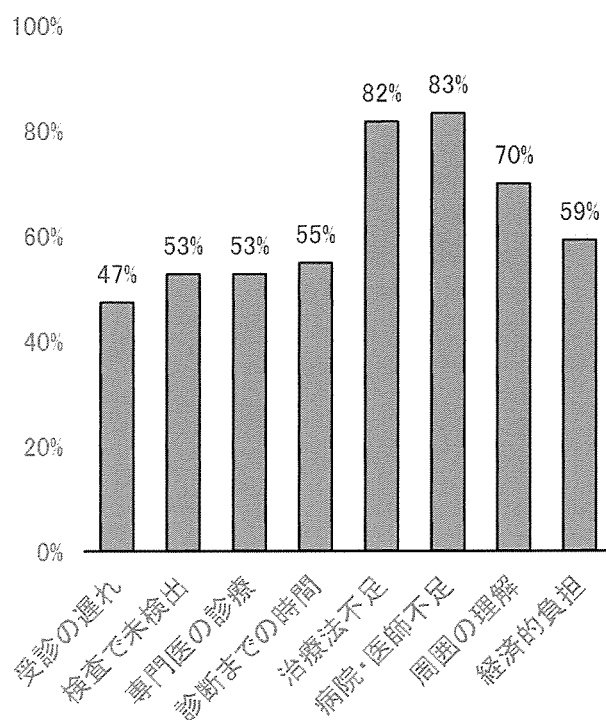


図3 ペイシェント・ジャーニーにおける筋ジス患者の困難(不満)

筋ジストロフィー関連モデルマウスの生産・供給システムの検討

保田 昌彦

公益財団法人実験動物中央研究所

緒言

筋ジストロフィーの要因究明や治療研究のために、我々は継続して、筋ジストロフィー関連モデルマウスならびにそのコントロール系統を微生物学および遺伝学的統御のもとで維持し、研究班をはじめとする多くの研究グループに供給してきた。また、筋ジストロフィー研究に適したモデルマウスの育成を目的に育種繁殖技術ならびに生殖工学技術の開発に努め、これらの技術を応用した実験動物学的改良を行ってきた。

1として、より高い精度と再現性を得られる動物実験のために維持動物の品質管理を継続的に実施してきた。2として、モデルマウスおよびコントロール系統マウスを永続的に維持し、国内研究機関へ継続的な供給を行った。3として、既存モデルマウスの背景系統の改良ならびに置換、新規モデルマウスの作出を行った。

方法・結果

1. 維持動物の品質管理

維持動物の品質管理のため、ビニールアイソレーター (VI) 装置内で管理している維持動物の定期的な微生物学および遺伝学的なモニタリング検査を定期的に継続的に実施している。令和5年度も微生物モニタリングは、VIあたり1ヶ月もしくは3ヶ月に1回の頻度で、実中研 ICLAS モニタリングセンターの全検査項目の検査を実施し、全項目陰性であることを確認した。遺伝モニタリングは、年1回もしくは2-3世代に1回の頻度で、STR マーカーによる遺伝的プロファイルを作成し、遺伝学的品質が守られていることを確認した。

2. 筋ジストロフィーモデルマウスの維持とタネ動物の供給

我々は、筋ジストロフィー関連モデルマウスの C57BL/6J-dy、C57BL/10 (B10)-mdx、C57BL/6J-mdx、B10-mdx. utrophin KO、NOG-mdx、DBA/2N (D2)-mdx、D2-mdx-IL2RgKO、RAG2 KO およびこれらのコントロール系統マウスを VI 内での交配ならびに胚の凍結保存によって維

持し、原則として繁殖用タネ動物を当班員もしくは外部研究者の要望に応じて供給してきた。令和5年の供給実績は、国内22機関に52回供給し、B10-mdx を908匹、そのコントロール系統 B10Jic を30匹、D2-mdx を141匹とその胚を140個、NOG-mdx を15匹の累計1094匹の動物と140個の胚を分与・供給した。この供給実績は、昨年の実績に次ぐ最高水準であった。

3. 筋ジストロフィーモデルマウスの管理・供給体制の確立と新規モデルマウスの作出

モデルマウス供給数増加に対応するため、B10-mdx マウスの生産を実研から日本クレア株式会社に完全移管した。また B10-mdx の背景コントロール系統として C57BL/10ScSnJic (B10Jic) を樹立し、10週齢ならびに26週齢の背景データを取得し、mdx 表現型の再現性を確認した。さらに、再生医療研究により有用な筋ジストロフィー・モデル動物を作出することを目的として、筋ジストロフィーの免疫不全モデルである NOG-mdx [1] に加え、筋力低下を呈する D2-mdx を背景とした免疫不全モデルを作製し、DBA/2N-mdx-IL-2RgKO、RAG2KO 系統を樹立、供給体制を整え、背景データの取得を実施中である。

考察・結論

筋ジストロフィーモデル動物の品質管理については、高い水準の微生物・遺伝モニタリング検査を定期的実施することで、再現性あるモデル動物を研究班の班員を含めた筋ジストロフィー研究者に継続的に供給し、再生医療を含めた筋ジストロフィー治療の基礎研究に寄与することができた。その供給実績は、機関数および匹数ともに令和4年に次ぐ最高水準であった。近年の特徴として国内製薬メーカーへの供給数の増加が挙げられる。維持しているモデル動物について、既存の B10-mdx の背景コントロール系統 B10Jic の再整備ならびに B10 系統よりも汎用性の高い C57BL/6J 系統への置換を実施し、モデルマウスの遺伝的な信頼性の強化に努めるとともに、代替系統モデルの構築を実施した。また新規免疫不全モデルである DBA/2N-mdx-IL-2RgKO、RAG2KO 系統を樹立し、筋ジストロフィーの再生医療等研究に寄与するための供給体制を構築した。今後、この体制の中で筋ジストロフィーモデルマウスの胚バンクセンターとしての役割を充実・発展させる。

参考文献

1. Nalbandian M, Zhao M, Sasaki-Honda M, Jonouchi T, Lucena-Cacace A, Mizusawa T, Yasuda M, Yoshida Y, Hotta A, Sakurai H. Characterization of hiPSC-derived muscle progenitors reveals distinctive markers for myogenic cell purification toward cell therapy. Stem Cell Reports, 16: 1-16, 2021.

Dp71 特異的遺伝子改変マウスを用いた DMD 分子病態研究

藤本 崇宏

京都府立医科大学大学院医学研究科

緒言

ジストロフィン遺伝子の異常は筋壊死とさまざまな程度の神経発達症を主徴とする神経筋疾患をもたらす。脳や筋組織以外の広範囲の諸臓器においても同遺伝子の全長型産物または短鎖産物が発現しているが、神経・筋組織以外での病態形成の有無や分子機能の実態は不明である。本研究では全身臓器・組織におけるジストロフィン短鎖産物 Dp71 の発現・分子複合体の実体を、分子・細胞・マウス組織レベルで明らかにすることで、ジストロフィン異常症の分子機序解明と分子標的創出に寄与することを目標とする。近年、我々は Dp71 を全長型ジストロフィン Dp427 と区別して検出することを可能にする遺伝子改変マウス (HA-Dp71 マウス) を樹立し、マウス海馬および小脳における Dp71 と Dp427 の発現プロファイルを報告してきた (参考文献 1, 2)。さらに発展させるべく、ヒト症例報告があったジストロフィン遺伝子ミスセンス変異に着目し、同変異を有するモデルマウスの樹立に着手した。

方法

HA-Dp71 マウスの受精卵を宿主として、CRISPR-Cas ゲノム編集技術によって標的とする塩基に変異を有する一本鎖オリゴヌクレオチドの導入を試みた。

結果

F0 マウス 45 匹中 35 匹に目的としたミス

センス変異の導入をサンガーシーケンス解析で検出できた。現在 F1 マウスを作成して次世代への変異遺伝子の伝播を試みている。

考察

今年度の 10 月より分担研究者として研究班に参加し当該研究を開始したが、ゲノム編集技術の使用により迅速かつ高効率で F0 マウスの獲得に至った。今後樹立されるジストロフィン遺伝子ミスセンス変異マウスを用いて表現型解析を行うことで、希少症例ではあるがミスセンス変異によって神経発達症を発症する病態機序の解明に資する所存である。野生型マウスではなく、我々が独自に保有する HA-Dp71 マウスを宿主に用いたことにより、ミスセンス変異を有する Dp71 蛋白の動態を Dp427 と区別してマウス組織レベルで検討できる点に優位性がある。すなわちミスセンス変異がもたらすマウス個体レベルの表現型と変異分子病態の両者の理解に資するモデルマウスになることを期待する。

結論

HA-Dp71 マウスを宿主としたミスセンス変異モデルマウスの樹立の目途が立った。HA-Dp71 マウスの有用性に関する知見は今後も積み上げていきつつ、ミスセンス変異マウスとの比較研究によって病態解明や分子標的の創出に繋げる。

参考文献

1. Fujimoto T et al., Cell Mol Life Sci. 2022;79(2):109.
2. Fujimoto T et al., Mol Neurobiol. 2023;60:3664-3677.

Development of novel therapies for neuromuscular disorders using animal models

Principal Investigator: Yoshitsugu Aoki, MD, PhD

Director, Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology and Psychiatry

Project period: FY2023

We have achieved significant progress in developing new therapies utilizing disease model animals in our research endeavours. Our accomplishments include creating the world's smallest micro-miniature pig model for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) and completing a comprehensive skeletal and cardiac muscle pathology analysis. We developed a mouse model with a specific tag inserted into the dystrophin short product (Dp71), identifying Dp71-expressing cells in the cerebellum and their functional relationship with AQP4 and Kir4.1 channel proteins in Bergmann glia. Administering Dp140 mRNA directly into the amygdala of mdx52 mice improved excitatory synaptic responses and ameliorated abnormal social behaviour (Prog Neurobiol, 2023). Using long-read snRNA-seq data from human brain tissue, we discovered high DP140 expression in excitatory neurons of the deep cortex, particularly in cells marked by serotonin receptor HTR2C. In stem cell research, we developed a method to differentiate motor neurons from urine-derived cells and successfully created 3D brain organoids from urine-derived cells of DMD patients. Additionally, we developed a method using microRNA switches to differentiate and purify skeletal muscle stem cells from human iPS cells, elucidating the differentiation mechanism of mesenchymal stem cells in response to "field logic" within the body (iScience, 2023; Cell Commun Signal, 2023). Furthermore, we identified mesenchymal progenitor cells intrinsic to skeletal muscle, revealing their dual role in muscle maintenance/enhancement and promoting fibrosis and adipogenesis, thus exacerbating the pathology (Nat Rev Endocrinol, 2023). We clarified the significance of R-loops mediated by TUG1 at microsatellite loci necessary for cell proliferation (Nature Communications, 2023). Additionally, we created a dominant genetic LMNA mutation mouse model replicating cardiomyopathy and demonstrated the potential of supplementation through oligodendrocytes to inhibit ALS progression (Frontiers in Cellular Neuroscience, 2023). Our initiatives also included advancing preclinical studies on in vivo genome editing using lipid nanoparticles loaded with CRISPR-Cas9 for muscular dystrophy mice. We enhanced and reported the accuracy of the eSkip-Finder web interface for predicting antisense sequences (Pharmaceutics, 2023), enabling sequence prediction and therapeutic modality evaluation, thus establishing a high-throughput research infrastructure for developing new exon-skipping drugs.

RESEARCH & RELATED Senior/Key Person Profile

- Principal Investigator
National Center for Neurology and Psychiatry
Yoshitsugu Aoki, Director
- Co-Investigators
National Center for Neurology and Psychiatry
Tatsuo Mano, Section Chief
Satoru Noguchi, Section Chief
Rieko Muramatsu, Director
Shin'ichiro Hayashi, Section Chief

Eisuke Doi, Section Chief
Shuuji Wakatsuki, Section Chief
Katsura Minegishi, Section Chief
Daisuke Kawauchi, Section Chief
Kyoto University
Akitsu Hotta, Associate Professor
Kyushu University
Akiyoshi Uezumi, Professor
Osaka University
Soichiro Fukada, Professor
Tokyo University
Kanjiro Miyata, Professor
IMSUT, Tokyo University
Takashi Okada, Professor
Tokyo University of Agriculture and Technology
Masaki Inada, Associate Professor
Kyoto University
Hidetoshi Sakurai, Associate Professor
Ehime University Graduate School of Medicine
Motoi Kanagawa, Professor
Sapporo Medical University
Takashi Yamada, Associate Professor
Tohoku University
Mari Dezawa, Professor
RIKEN
Yasushi Okuno, RIKEN Center for Computational Science, Director
Fujita Health University Hospital
Mariko Ikeda, Associate Professor
Shizuoka Prefectural Research Institute of Animal Industry
Masayoshi Otake, Director
Central Institute for Experimental Animals
Masahiko Yasuda, PhD
Japan Muscular Dystrophy Association
Tamotsu Takeda, Representative Director
Kyoto Prefectural University of Medicine
Takahiro Fujimoto, Lecturer
Tohoku University
Naoki Suzuki, Assistant Professor
Alberta University
Toshifumi Yokota, Professor

STATEMENT OF WORK

Specific Aim 1

Development of new therapeutic interventions using animal models of neuromuscular diseases

- a. Development of genetic therapies for muscular dystrophies

Investigators: Aoki, Miyata, Echigoya, Hotta, Okada, Nakamura, Chiba, Yokota

- b. Development of stem cell-based therapies for muscular dystrophies

Investigators: Hayashi, Fukada, Uezumi

- c. Discovery of new pathological mechanisms in neuromuscular diseases

Investigators: Noguchi, Muramatsu, Seki, Kawauchi, Kanagawa, Yamada, Shindo, Mori, Suzuki N

Specific Aim 2

Quality Control of Experimental Animals

Investigator: Yasuda

Specific Aim 3

Ethical and social studies to develop new treatments for muscular dystrophies

Investigator: Takeda